Charakterisierung der adhärenten Zellkomponenten virus-transformierter Mäusefibroblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Hagmann
aus Ravensburg

1980

Charakterisierung der adhärenten Zellkomponenten virus-transformierter Mäusefibroblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Wolfgang Hagmann
aus Ravensburg

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 7. 1980

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F.A. Anderer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Probst

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 1977 bis September 1979 am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. F.A. Anderer durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. F.A. Anderer für die Stellung des Themas und die Beratung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0056

A b s t r a c t

HAGMANN, WOLFGANG:
CHARAKTERISIERUNG DER ADHÄRENTEN ZELLKOMPONENTEN VIRUS-TRANSFORMIERTER MÄUSEFIBROBLASTEN

Die adhärenten Strukturen zweier virus-transformierter Zelllinien (STU51A/232B, STU-D17) wurden untersucht unter verschiedenen Substrat-Bedingungen (Glas- und Plastik-Kulturgefäße) bei Wachstum in Platten- und in Suspensionskultur. Durch Vormarkierung der Zellen bzw. durch endogene Phosphorylierung der adhärenten Zellstrukturen konnte mit einer stufenweisen Elution ein Maß für die Adhäsionskapazität zellulärer Komponenten festgelegt werden. Als Parameter wurde die spezifische Radioaktivität oder die relative radioaktive Markierung bestimmter Zellkomponenten verwendet. Bei Vormarkierung mit radioaktivem Leucin erwies sich eine Proteingruppe mit 18-25 Kd als besonders adhäsiv. Bei der endogenen Phosphorylierung mit γ-(^{32}P)-ATP fiel eine Gruppe von Phosphoproteinen mit 34-45 Kd durch hohe Adhäsionskapazität auf. Die Identität dieser beiden Proteingruppen wurde diskutiert. Neben den beiden stark adhäsiven Proteingruppen fanden sich bei den adhärenten Strukturen beider Zellinien eine Reihe weiterer Proteine, Glykoproteine und sulfatierter Glykoproteine, denen aber nach den Kriterien der stufenweisen Elution keine hohe Adhäsionskapazität zugesprochen werden kann. Zwischen den beiden untersuchten Zellinien traten Unterschiede auf in den Kohlenhydrat- und Schwefel-haltigen adhärenten Komponenten, vor allem über 400 Kd. Dagegen konnte kein Einfluß der chemischen Natur des verwendeten Kultursubstrats auf die Art und Zusammensetzung zellulärer Adhäsionsstrukturen gefunden werden. Es wurde ferner festgestellt, daß auch bei Suspensionskulturen von STU51A/232B-Zellen Substrat-adhärente Komponenten gefunden werden, wie sie diese Zellen bei adhärentem Wachstum bilden.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Ergebnisse	5
1.	Biologische Systeme	5
1.1.	STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur	6
1.2.	STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur	8
1.3.	STU-D17-Zellen in Plattenkultur	9
2.	Präparation der adhärenten Membrankomponenten	11
2.1.	Modellvorstellung für die Substratadhäsion von Zellen	11
2.2.	Ablösung der Zellen vom Substrat	12
2.2.1.	Ablösung der Zellen mit EGTA- und EDTA-haltigem Puffer	14
2.2.2.	Ablösung der Zellen mit Ca^{2+}-, Mg^{2+}-freiem Puffer	16
2.3.	Ablösung der adhärenten Proteine	18
2.3.1.	Ablösung der adhärenten Proteine mit SDS-haltigem Puffer und Alkali	19
2.3.2.	Alternative Methoden zur Ablösung adhärenter Proteine	21
2.4.	Kontrolle der unspezifischen Adsorption von Mediumkomponenten am Substrat	23

Seite

2.4.1. Unspezifische Adsorption von Mediumkomponenten am Glas-Substrat 24

2.4.2. Unspezifische Adsorption von Mediumkomponenten am Plastik-Substrat 30

2.5. Kontrolle der unspezifischen Adsorption von radioaktiv markierten Vorstufen am Substrat 34

2.6. Kontrolle der ins Kulturmedium sezernierten Zellkomponenten 36

2.6.1. Zellkomponenten im Kulturmedium von adhärent wachsenden STU-D17-Zellen 37

2.6.2. Zellkomponenten im Kulturmedium von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur 38

3. Charakterisierung der adhärenten Zellkomponenten 40

3.1. Densitometrische Analyse nach der elektrophoretischen Auftrennung 40

3.1.1. Adhärente Proteine am Glas-Substrat 40

3.1.2. Adhärente Proteine am Plastik-Substrat 45

3.2. Charakterisierung der adhärenten Zellkomponenten durch de novo-Synthese 48

3.2.1. Markierung der adhärenten Zellproteine mit radioaktivem Leucin 48

3.2.1.1. ^{14}C-Leucin-markierte Proteine von STU-D17-Zellen am Glas-Substrat 49

Seite

3.2.1.2. ^{14}C-Leucin-markierte Proteine von STU-D17-Zellen am Plastik-Substrat 54

3.2.1.3. ^{14}C-Leucin-markierte Proteine von STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur 58

3.2.1.4. ^{3}H-Leucin-markierte Proteine am Glas-Substrat von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur 65

3.2.2. Markierung der adhärenten Zellkomponenten mit radioaktiver Fucose 69

3.2.2.1. ^{3}H-Fucose-markierte adhärente Komponenten von STU-D17-Zellen 70

3.2.2.2. ^{3}H-Fucose-markierte adhärente Komponenten von STU51A/232B-Zellen 74

3.2.3. Markierung der adhärenten Zellkomponenten mit radioaktivem Glukosamin und Sulfat 77

3.2.3.1. ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierte adhärente Komponenten von STU-D17-Zellen 79

3.2.3.2. ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierte adhärente Komponenten von STU51A/232B-Zellen 83

3.2.4. Endogene Phosphorylierung der adhärenten Komponenten von STU51A/232B-Zellen mit γ-(^{32}P)-ATP 87

		Seite
III.	Zusammenfassung	93
IV.	Diskussion	95
V.	Material und Methoden	103
VI.	Literaturverzeichnis	111

I. Einleitung

Die Fähigkeit von Zellen zur Adhäsion ist eine ihrer fundamentalen Eigenschaften. Sie spielt eine Rolle in Entwicklungsvorgängen wie z.B. der Zellwanderung während der Embryogenese und Morphogenese, als Antwort auf bestimmte extrazelluläre Matrizen (1-6). Sie ist von Bedeutung in homöostatischen Prozessen wie Gewebe- und Organstabilität, Thrombose, Entzündung und Wundheilung (7-15). Dabei treten die adhäsiven Eigenschaften der Zellen sowohl in Form von Zell - Zell - Adhäsion wie Zell-Matrix- (Zell-Substrat) Adhäsion in Erscheinung.

Verlust und Formation von interzellulärer und Zell-Substrat-Adhäsion sind wahrscheinlich auch ursächlich am Problem der zellulären Onkogenese, am invasiven und metastasierenden Verhalten von malignen Zellen beteiligt(16-23). Neoplastischen Zellen wird schon lange eine abnorme Adhäsivität zugesprochen(24-27). Eine Verringerung der zellulären Adhäsivität ist bei metastasierenden Zellen möglicherweise ein Faktor, der ein Ablösen von Zellen von der primären Tumorzellmasse bewirkt. Bei der Invasion von Tumorzellen in normales Gewebe dagegen müssen die bösartigen Zellen aktiv eindringen und gesundes Gewebe angreifen, wobei vielleicht, unter vielen anderen Kriterien, eine höhere Adhäsivität der Tumorzellen zu normalen Zellen- höher als diese sie untereinander aufweisen- zum Tragen kommt.

Zur Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften von Zellen im experimentellen System sind drei Ansätze zu unterscheiden; zwei davon, nämlich Zell-Substrat-Adhäsion und Zell-Zell-Adhäsion (interzelluläre Adhäsion), kann man als in vitro-Ansätze betrachten, da sie allgemein als zelluläre Modelle unter Verwendung von Zellen in Gewebekultur untersucht werden. Als dritter Ansatz kann das Adhäsionsphänomen direkt im Tierversuch untersucht werden, wobei die vereinigten Wechselwirkungen von malignen Zellen mit den normalen im Wirtstier die Anlage von Metastasen im Wirtstier bestimmen. Von diesen drei Ansätzen ist für die Zell-Substrat-Adhäsion, d.h. das Anhaften von Zellen an künstlichen Matrizen, z.B. an ein Gewebekulturgefäß, experimentell bei weitem am leichtesten eine Modellvorstellung zu entwickeln, und man hat für die Analyse des Adhäsionsvorganges sowie für die Identifizierung der dabei beteiligten molekularen Strukturen ein relativ einfaches System,das aber in seiner Simulierung von in vivo-Verhältnissen doch eine gewisse Relevanz besitzt.

Man weiß inzwischen, daß es zwei biochemisch verschiedene Typen von Zell-Substrat-Adhäsion gibt, je nachdem, ob das experimentelle System im Kulturmedium Serum enthält oder nicht. In Abwesenheit von Serum findet wahrscheinlich eine direkte, passive Adsorption von Zellen am Substrat statt, d.h. unabhängig von der Lebensfähigkeit oder dem metabolischen Zustand der Zellen. Andererseits findet in Gegenwart von Serum eine a k t i v e Adhäsion statt, die auf intakte und metabolisch aktive Zellen angewiesen ist(28-35).

Grinnell (36) betont, daß nur die letzteren Bedingungen physiologischen Zuständen entsprechen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Zell-Substrat-Adhäsion nur in Gegenwart von Serum untersucht. Es ist bekannt, daß Serum-Komponenten des Kulturmediums sich an der Substratoberfläche ablagern und sich auf das metabolische Verhalten der sich anhaftenden Zellen auswirken (37-39).

Adhäsion und Wachstum von Zellen auf künstlichen Substraten (Glas, Plastik) wurden bisher am meisten mit Säugetier-Fibroblastenzellen untersucht. Als Resultat dieser Adhäsion tritt eine heterogene Mischung aus Proteinen, Glykoproteinen und Polysacchariden auf dem Substrat auf. Diese Komponenten bleiben fest adhärent auf dem Substrat zurück, wenn man Zellen schonend mit dem Ca^{2+}- spezifischen Chelatbildner EGTA ablöst(40). Studien von normalen und virus-transformierten Fibroblastenzellen lassen vermuten, daß das Substrat-adhärente Material tatsächlich eine Rolle in der Zell-Substrat-Adhäsion und in der Wachstumsregulation spielt (37, 41-45). Die biochemische Analyse der Substrat-adhärenten Strukturen ergab, abgesehen von den Serumkomponenten aus dem Kulturmedium, eine Beteiligung vor allem von Glykoproteinen, sulfatierten Glykosaminoglykanen und Proteinen, die aktiv von den Zellen gebildet wurden (43,44,46-49).

Diskrete Hinweise darüber, welche Komponenten die physikalische Adhäsion zum Substrat vermitteln, fehlen jedoch noch.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Substrat-adhärente Material untersucht, welches von virus-transformierten Mäusefibroblasten gebildet wird. Es sollten die molekularen Strukturen beschrieben werden, welche die Zellen a k t i v für die Adhäsion synthetisieren. Dabei galt es, diese zellspezifischen Produkte von unspezifischem, aus dem Serumhaltigen Medium am Substrat anhaftenden Material zu unterscheiden.
Vom Interesse war auch, ob die Zellen auf verschiedene künstliche Substrate (Glas, Plastik) mit der Synthese ähnlicher oder verschiedener Adhäsionssubstanzen reagieren.
Ferner galt es zu zeigen, ob das Substrat-adhärente Material in seiner Zusammensetzung abhängig davon ist, mit welchem Virus die ansonsten identischen Zellen transformiert wurden, oder ob es sich bei den Substrat-adhärenten Strukturen eher um endogene Komponenten der Zellen handelt.
Darüberhinaus sollte die Adhäsionskapazität der gefundenen, Substrat-adhärenten Komponenten untersucht werden.

II. Ergebnisse

1. Biologische Systeme

Für die folgenden Untersuchungen wurden zwei permanente Zellinien gewählt, die durch Transformation von embryonalen Fibroblastenzellen des Mäuse-Inzuchtstammes STU durch zwei verschiedene Tumorviren entstanden sind. Zur Transformation der Zellen wurden einerseits das DNS-Tumorvirus SV 40 und andererseits das RNS-Tumorvirus RSV (Rous Sarcoma Virus, Schmidt-Ruppin Stamm) benützt.

Zur Verwendung kamen die beiden Zellinien vor allem aus zwei Gründen: Beide Zellinien stammen aus derselben Zellpopulation von embryonalen Fibroblastenzellen und sollten sich lediglich durch die virus-spezifisch codierten und induzierten Proteine unterscheiden. Daher konnte mit diesen beiden Zellinien untersucht werden, ob bei den analysierten subzellulären Strukturen und adhärenten Komponenten virusspezifische Unterschiede festzustellen sind.

Andererseits lassen sich die SV 40-transformierten Zellen sowohl in Suspensionskultur als auch in Plattenkultur ziehen. Diese Tatsache ermöglicht Vergleiche darüber, ob zwischen Wachstum in Suspension und adhärentem Wachstum ein und derselben Zellinie Unterschiede in den molekularen Strukturen der Zelloberfläche und möglicherweise auch bei den adhärenten Komponenten auftreten.

Die mit dem RNS-Tumorvirus RSV (Schmidt-Ruppin Stamm) trans-

formierten Zellen wurden freundlicherweise von Prof.Dr. H.Bauer, Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Diese Zellinie trägt die Bezeichnung STU-D 17.
Die mit dem DNS-Tumorvirus SV 40 transformierten Zellen leiten sich von der Zellinie STU-51A/232B ab (50) und entstammen ausschließlich der 500.Zellpassage.

1.1. STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur

Frisch ausgesäte STU51A/232B-Zellen gehen in Suspensionskultur nach einer Phase verzögerten Wachstums in eine exponentielle Wachstumsphase (log-Phase) über (Abb.1, S.7). In diesem Zustand weisen die Zellen eine konstante Generationszeit von 16 Stunden auf. Die Verteilung der Zellen über die verschiedenen Stadien des Zellzyklus und die Dauer dieser Stadien bleiben bei Verdünnung der Kulturen mit frischem Medium in geeigneten zeitlichen Abständen konstant. Zellen in der log-Phase zeichnen sich durch einen mitotischen Index von 4.5- 5% aus. Der Anteil der DNS-synthetisierenden Zellen beträgt 69$^{\pm}$ 5% (51). Wird eine Zellkultur in diesem Zustand nicht verdünnt, so geht sie ca. 28 Stunden nach Aussaat in eine stationäre Phase über, in welcher die Zellzahl pro ml konstant bleibt. Die Mitoserate der Zellen sinkt dabei auf 0.5-0.7% ab, und weniger als 1% der Zellen synthetisieren noch DNS (51). Der Anteil der toten Zellen

beträgt in der log-Phase 1.0-1.3%, in der stationären Phase steigt er stark an.

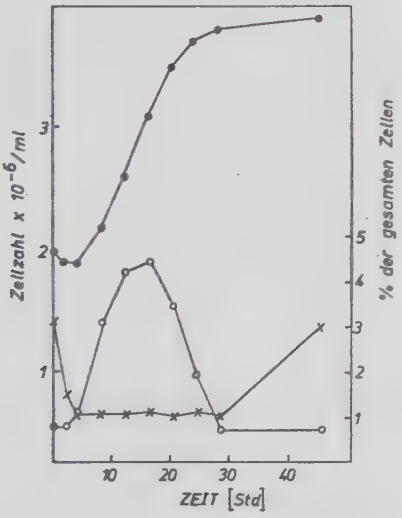

Abb.1. Wachstumskurve einer Population von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur. —●—● : Zellzahl x 10^{-6}/ml, —o—o— : Mitoserate (%), —x—x— : Tote Zellen (%)

1.2. STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur

Sowohl auf Glas- wie auf Plastiksubstraten (Polystyrol) lassen sich STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur halten. Nach der Aussaat bleiben die anfangs kugeligen Zellen in einer Phase verzögerten Wachstums, bis sie sich abflachen, ausbreiten und in eine logarithmische Wachstumsphase eintreten (Abb.2).

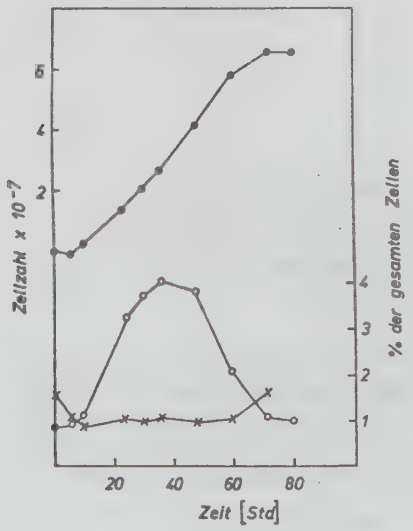

Abb.2. Wachstumskurve einer Population von STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur. —●— : Zellzahl x 10^{-7}, —○— : Mitoserate (%), —×— : Tote Zellen (%).

Diese adhärent wachsenden STU51A/232B-Zellen zeigen gegenüber den Zellen in Suspensionskultur eine leicht verlängerte Generationszeit von ca. 20 Stunden, während die übrigen Wachstumsparameter mit denen der Suspensionskultur vergleichbar sind.

Für die Experimente wurden adhärent wachsende STU51A/232B-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in die Versuchsgefäße mit einer Dichte von ca. 10% Konfluenz ausgesät. Nach einer Wachstumszeit von 60 Stunden in Kultur bedeckten die Zellen die Substratfläche zu ca. 90%; zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen am Ende der logarithmischen Wachstumsphase.

1.3. STU-D17-Zellen in Plattenkultur

Diese Zellinie weist ein Wachstumsverhalten auf, welches in den untersuchten Parametern (Zellvermehrung, Mitoserate, Anteil an toten Zellen) mit den adhärent wachsenden STU51A/232B-Zellen praktisch identisch ist (Abb.3, S.10). Auch diese Zellen haben eine Generationszeit von ca. 20 Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase; diese erreichen sie bei einer Aussaat von etwa 10% Konfluenz nach einigen Stunden. Die Zellen gehen nach 65 Stunden in Kultur in eine Phase konstanter Zellzahl (stationäre Phase) über und bedecken das Kulturgefäß zu etwa 90%.

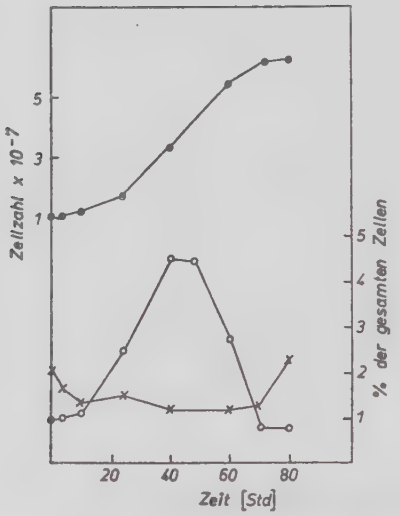

Abb.3. Wachstumskurve einer Population von STU-D17-Zellen in Plattenkultur. —●—● : Zellzahl x 10^{-7}, —○—○ : Mitoserate (%), —✕—✕ : Tote Zellen (%).

2. Präparation der adhärenten Membrankomponenten

2.1. Modellvorstellung für die Substrat-Adhäsion von Zellen

Die zelluläre Adhäsion auf künstlichen Substraten ist ein dynamischer Prozeß, der mit einer charakteristischen Folge morphologischer Veränderungen der Zellen einhergeht. Die Zellen gehen dabei von einem abgerundetem Zustand in einen abgeflachten, polygonalen Zustand über (29, 52, 53).
In diesem ausgebreiteten Zustand benutzen adhärent wachsende Fibroblastenzellen vor allem zellrandständige, gekräuselt erscheinende Membranbereiche, sogenannte Lamellipodien, zur Adhäsion (54, 55). Die Lamellipodien weisen eine große Zahl fingerartiger Ausstülpungen auf, die sich als solche oder in Form längerer Filopodien am Substrat festhaften können. Jeder permanente Kontakt zwischen Lamellipodien oder Filopodien und dem Substrat resultiert in einer Bildung von Adhäsionspunkten. Zur Adhäsion und Fortbewegung der Zellen auf dem Substrat werden solche Adhäsionsstellen kontinuierlich gebildet und aufgelöst. Die Adhäsionspunkte selbst neigen dazu, am Substrat haften zu bleiben, sodaß sich bei einer Entfernung des eigentlichen Zellkörpers durch Fortbewegung zunächst sogenannte Retraktionsfibrillen bilden, die schließlich abreissen und an den Adhäsionspunkten "Fußspuren" zurücklassen.

Neben den Adhäsionsstellen am Rande des Zellkörpers finden sich auch diskontinuierliche Zell-Substrat-Adhäsionen unterhalb des ganzen, dem Substrat zugewandten Zellkörpers (56-59). Auch ausgedehnte, eng am Substrat liegende Bereiche der Zelloberfläche wurden beobachtet, die möglicherweise Adhäsionsstellen der Zellen darstellen (54, 60-62). Solche "Adhäsionsplaques" werden aber nicht bei allen Zellinien gefunden (57, 61, 63). Jedenfalls scheint sicher zu sein, daß Zellen sich nicht mit der gesamten, dem Substrat zugewandten Oberfläche am Substrat festhaften, sondern nur mittels spezifisch dafür ausgebildeter Adhäsionszonen. Diese Vorstellung gilt allerdings nur für die Adhäsion zwischen Zellen und künstlichen Substraten. Eine Aussage über das Verhalten von Zellen bei interzellulärer Adhäsion läßt sich damit nur indirekt gewinnen.

2.2. Ablösung der Zellen vom Substrat

Zur selektiven Ablösung der adhärenten Strukturen, welche Zellen bei der Zell-Substrat-Adhäsion ausbilden, bedarf es zunächst einer schonenden Ablösung der intakten Zellen. Dabei sollen die Zellen bei ihrer Ablösung diejenigen Teile der Zelloberfläche auf dem Substrat hinterlassen, welche an der Zell-Substrat-Adhäsion direkt beteiligt sind, und die dann anschließend, nach dem Entfernen der Zellen, mit stärkeren Mitteln vom Substrat abgelöst werden können. Diese

schonende Ablösung der adhärent gewachsenen Zellen entspricht den Vorgängen, welche auch bei der kontinuierlichen Adhäsion und Fortbewegung der Zellen in der Gewebekultur auftreten (64).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, adhärente Zellen vom Substrat abzulösen. Die Verwendung von Chelatbildnern wie EDTA und EGTA macht sich die Tatsache zunutze, daß die adhäsiven Strukturen der Zellen Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen zu ihrer Funktion benötigen. Ein entscheidender Vorteil beim Einsatz von EGTA (und EDTA) ist dabei, wie sich im Interferenz-Reflexions-Mikroskop zeigt, die zunächst unveränderte Erhaltung der Adhäsionspunkte unter Einwirkung des Chelatbildners (64). Die Zellen bleiben intakt, und die Zellkörper ziehen sich unter Abrundung von den Adhäsionszonen zurück, wobei sich Retraktionsfibrillen zu den Adhäsionspunkten ausbilden und letztlich abreißen. Allerdings besteht bei der Verwendung von EGTA (und EDTA) die Gefahr des partiellen Verlustes äußerer, labiler Zellmembrankomponenten, die somit bei dieser Methode eventuell nicht voll erfaßbar sind.

Eine enzymatische Ablösung der Zellen vom Substrat mit proteolytischen Enzymen wie Trypsin ist für die vorliegenden Untersuchungszwecke nicht angebracht. Durch die enzymatische Einwirkung würden ja gerade die Strukturen an der Zelloberfläche zerstört. Daß dies auch für die dem Enzym schlecht

zugänglichen Adhäsionsstellen gilt, zeigten Rees et al. (64, 65): Bei der Behandlung von adhärenten Zellen mit Trypsin tritt zunächst eine Schädigung von Proteinen an der Zelloberfläche auf, ohne daß sich die Zellen dabei schon abrunden und ablösen; letzteres ist vielmehr der sekundäre Schritt.

Als weitere Möglichkeit der Ablösung von Zellen kommt eine mechanische Ablösung z.B. mit einem Gummischaber in Betracht. Die hierbei auftretenden Scherkräfte wirken sich aber sehr unspezifisch auf alle labilen äußeren Zellstrukturen aus, also auch auf nicht-adhärente Zellteile, sodaß Bruchstellen an der Zelloberfläche auftreten, die keineswegs selektiv nur an der Adhäsion beteiligte Strukturen betreffen. Außerdem bringt die mechanische Ablösungsmethode die Gefahr einer Zell-Lyse und einer sekundären, unspezifischen Adhäsion lytischer Produkte am Substrat mit sich.

2.2.1. Ablösung der Zellen mit EGTA- und EDTA-haltigem Puffer

Culp und Black (40) zeigten, daß die Behandlung von Substrat-adhärenten Balb/c3T3 und SV 40-transformierten Mäusezellen mit dem Ca^{2+}-spezifischen, Chelatkomplexe bildenden EGTA eine effiziente Ablösung der Zellen vom Substrat ermöglicht.

Durch die Verwendung von EGTA werden lediglich die Ca^{2+}-abhängigen Zellstrukturen gestört und das eingangs erwähnte Risiko beim Einsatz von Chelatbildnern weiter reduziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die adhärenten STU-D17-Gewebekulturen nach Dekantieren des Kulturmediums und vorsichtigem, einmaligem Abspülen mit PBS (37°C) mit je 20 ml (Roux-Schale) bzw. 10 ml (Falcon-dish) vorgewärmtem (37°C) PBS versetzt, das 0.5 mM EGTA und 2 mM PMSF enthielt, und die Zellen auf einem Rotationsschüttler bei 120 rpm, 37°C abgelöst. Nach 30 Minuten Schütteln waren die Zellen vom Glas- und vom Plastik-Substrat vollständig abgelöst und konnten dekantiert werden. Ein mehrmaliges Nachspülen mit der obigen Lösung entfernte die restlichen Zellen vom Substrat. Die vollständige Entfernung der Zellen wurde dadurch überprüft, daß bei Kontrollgefäßen nach dieser Behandlung kein weiteres Zellwachstum festgestellt werden konnte.
Im Überstand des Ablöse-Puffers und den weiteren Nachspülvolumina konnten außerdem, nach Abzentrifugieren der Zellen (5 Minuten, 200xg), keine zellulären Proteine mehr nachgewiesen werden. Unter den angewandten Bedingungen wurden also durch den EGTA-haltigen Puffer keine nachweisbaren Mengen an zellulären, insbesondere peripheren Membranproteinen, abgelöst.

Die Ablösung der Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt. Durch diese Art der Ablösung änderte sich der Anteil der toten Zellen an der Gesamtpopulation im Vergleich zum adhärenten Zustand nicht.

Setzt man dem Ablösungs-Puffer EDTA statt EGTA zu, so ergibt sich für das Ablöseverhalten der adhärenten STU-D17-Zellen das gleiche Bild wie mit EGTA-haltigem Puffer: Nach 30 Minuten bei 120 rpm auf dem Rotationsschüttler mit 20 ml (Roux-Schale) bzw. 10 ml (Falcon-dish) von 0.5 mM EDTA, 2 mM PMSF in PBS, pH 7.2 bei 37°C lösen sich die Zellen vollständig ab. Ein unterschiedliches Ablöseverhalten bei Glas- oder Plastik-Substrat ist dabei nicht festzustellen.

2.2.2. Ablösung der Zellen mit Ca^{2+}-, Mg^{2+}-freiem Puffer

Nach Santala (66) erfolgt eine Ablösung adhärenter Zellen mit Ca^{2+}-, Mg^{2+}-freiem Puffer schonender als bei der Verwendung von EGTA oder EDTA.

Daher wurden dichtgewachsene STU-D17-Zellen nach Dekantieren des Kulturmediums einmal vorsichtig abgespült mit Ca^{2+}-, Mg^{2+}-freier Hank's Lösung (37°C), die 0.02 M HEPES enthielt. Das anschließende Ablösen der Zellen mit 20 ml (Roux-Schale) bzw. 10 ml (Falcon-dish) der obigen Lösung durch Abspülen

des Zellrasens mit einer Pasteur-Pipette bei 37°C gelang nur unvollständig. Daher wurden die adhärenten Zellen statt dessen, nach einmaligem Abspülen mit dem Ca^{2+}-, Mg^{2+}-freiem Hank's/0.02 M HEPES-Puffer (20 ml/Roux-Schale, 10 ml/Falcon-dish) auf einem Rotationsschüttler mit 120 rpm bei 37°C geschüttelt. Nach 30 Minuten Schütteln waren 80-90% der Zellen vom Substrat gelöst und wurden dekantiert. Die restlichen noch anhaftenden Zellen ließen sich durch mehrmaliges Abspülen mit obigem Puffer durch eine Pasteur-Pipette nicht vollständig vom Substrat ablösen. Bei diesem Ablöseverhalten der STU-D17-Zellen war kein Unterschied zwischen Glas- und Plastik-Substrat festzustellen. Die Ablösung fand unter sterilen Bedingungen statt.

Die Ablösung der Zellen vom Substrat war also mit dem Ca^{2+}-, Mg^{2+}-freien Puffer nicht in befriedigendem quantitativen Maße zu erreichen. Verglichen mit der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Methode der Zellablösung mit EGTA-haltigem Puffer war demnach eine Ablösung der adhärenten Zellen mit EGTA-haltigem Puffer vorzuziehen. Da sich die Ablösung der Zellen durch den EGTA-haltigen Puffer durch eine gute Effizienz auszeichnet und die Zellen dabei weitgehend intakt bleiben, wurde diese Methode im Folgenden ausschließlich verwendet.

2.3. Ablösung der adhärenten Proteine

Nach der quantitativen Ablösung adhärenter Zellen vom Substrat mit EGTA-haltigem Puffer bleibt ein geringer Teil von zellulären Proteinen und Glykoproteinen, außerdem auch Serum-Komponenten, fest gebunden am Substrat zurück (40). Um diese zellulären, von Punkten der Adhäsion stammenden Strukturen sowie alle sonstigen adhärenten Bestandteile quantitativ vom Substrat zu lösen, kann man entweder stark alkalische oder Detergens-haltige Puffer verwenden (40, 49). Nach Culp und Black (40) werden Substrat-adhärente zelluläre Komponenten mit 0.1%iger SDS-Lösung nach 30 Minuten Schütteln bei 37°C bereits quantitativ von der Substratfläche abgelöst. Allerdings gilt dies nicht für die Ablösung aller adhärenten Serumproteine.
Nach Grinnell(67) lassen sich dagegen mit alkalischer Lösung alle adsorbierten und adhärentenKomponenten ablösen.

Im Folgenden werden diese Möglichkeiten zur Ablösung adhärenter Proteine näher untersucht. Alle Versuche dieses Kapitels wurden mit STU-D17-Zellen durchgeführt.

2.3.1. Ablösung der adhärenten Proteine mit SDS-haltigem Puffer und Alkali

Die Ablösung adhärenter Komponenten erfolgte sequentiell unter verschiedenen Pufferbedingungen. Dabei sollten die von Culp (40) und Grinnell (67) beschriebenen differentiellen Ablösungsverhalten von zellulären und Serum-Proteinen ausgenutzt werden, indem nach Einsatz von SDS-haltigen Puffern noch mit alkalischer Lösung nachgewaschen wurde, um alle adsorbierten und adhärenten Serum-Komponenten abzulösen.

Dazu wurden zu den von Zellen quantitativ befreiten Kulturgefäßen (s.Kap. 2.2.1) 1% SDS, 10 mM Tris/EDTA, 1% Mercaptoäthanol, 2 mM PMSF, pH 9.0, 37°C (20 ml/Roux-Schale, 1o ml pro Falcon-dish) gegeben und die Gefäße damit 30 Minuten bei 120 rpm auf einem Rotationsschüttler eluiert. Diese Elution wurde ein Mal wiederholt mit dem gleichen Volumen frischen Elutionspuffers. Bis einschließlich dieser zweiten Elutionsstufe erfolgte die gesamte Aufarbeitung unter sterilen Bedingungen. Es folgten eine 3. und 4. Elution mit den gleichen Volumina an 1% SDS, 1% Mercaptoäthanol für 3 Minuten bei 80°C. Anschließend wurden die Kulturgefäße noch 2 mal mit 0.1 N NaOH für je 2 Minuten bei Zimmertemperatur eluiert.

Die Eluate jeder Stufe wurden, nach Elutionsstufen getrennt,

vereinigt und zunächst gegen 0.04% NaN_3, dann gegen H_2O bidest. bei Raumtemperatur erschöpfend dialysiert. Danach wurden die Dialysate lyophilisiert und geeignete Proben auf ihren Proteingehalt untersucht. Das Ergebnis dieser 6 Elutionsstufen zeigt Tabelle 1.

	Adhärente Proteine ($\mu g/cm^2$)	
	Glas	Plastik
1.Elution	1.0	1.0
2.Elution	0.6	0.5
3.Elution	0.2	0.1
4.Elution	0.1	0.1
5.Elution	-	-
6.Elution	-	-

Tab.1. Elutionsverhalten adhärenter Proteine von Glas- und Plastik-Substrat nach Inkubation der Kulturgefäße mit STU-D17-Zellen in Serum-haltigem Kulturmedium.

Quantitativ betrachtet, erhält man in den 4 Elutionsstufen mit SDS-haltigem Puffer, bei 37°C und 80°C, eine in der Reihenfolge der Elutionen abnehmende Menge an abgelösten Proteinen. In den beiden letzten Elutionsstufen mit 0.1 N NaOH lassen sich dagegen keine nachweisbaren Mengen an Proteinen mehr ablösen. Diese Methode der sequentiellen

Ablösung der adhärenten Proteine liefert insgesamt 1.9 µg Protein/cm^2 bei Glas-Substrat und 1.7 µg Protein/cm^2 bei Plastiksubstrat.

2.3.2. Alternative Methoden zur Ablösung adhärenter Proteine

Durchgeführt wurden Versuche zur vereinfachten Ablösung adhärenter Proteine mit NaOH, mit 0.1% SDS sowie mit 1%SDS, 1% Mercaptoäthanol.

Zur Ablösung der adhärenten Proteine mit NaOH wurden 20 ml 0.1 N NaOH (bei Roux-Schalen) bzw. 10 ml (bei Falcon-dishes) vorgewärmt (37°C) zu den Kulturgefäßen gegeben und 30 Minuten bei 37°C und 120 rpm auf einem Rotationsschüttler geschüttelt. Nach Abgießen des Eluats wurde in der gleichen Weise noch weitere 3 mal mit 0.1 N NaOH eluiert. Es zeigte sich, daß mit der ersten Eluierung 1.1 µg Protein/cm^2, bei der zweiten noch 0.3 µg Protein/cm^2 abgelöst werden können. Dagegen werden im 3. und 4. Eluat keine Proteine mehr in nachweisbarer Menge gefunden. Die Ablösung der adhärenten Proteine mit NaOH ist also unter den vorliegenden Bedingungen der Ablösung mit SDS-haltigen Puffern quantitativ unterlegen.

Eine analoge Ablösung der Kulturgefäße mit 1% SDS, 1% Mer-

captoäthanol bringt zwar eine erheblich bessere Ausbeute an Proteinen als die NaOH-Methode, doch lassen sich hierbei mit 1.6 µg Protein/cm^2 insgesamt auch weniger Proteine ablösen als mit der in Kap.2.3.1 beschriebenen Methode.

Um eine möglichst große Menge an Substrat-adhärenten Komponenten zu erhalten, wurden STU-D17-Zellen auch in Rollerflaschen (850 cm^2) kultiviert und abgelöst. Zur Ablösung der adhärenten Proteine wurden die von den Zellen befreiten Flaschen (s.Kap. 2.2.1) dann mit 80 ml/Flasche 0.1%iger SDS-Lösung 30 Minuten bei 37°C und 2.5 rpm gerollt. Bei dieser Art der Ablösung lassen sich in 4 Elutionsschritten nur 0.5 µg Protein/cm^2 ablösen, noch weniger als im Vergleich zu der Ablösung mit 0.1 N NaOH.

Die vereinfachten Ablösemethoden erwiesen sich insgesamt der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Methode bezüglich der quantitativen Ausbeute an adhärenten Proteinen unterlegen. Außerdem besteht nach Culp (68) bei der Ablösung adhärenter Proteine mit NaOH die Gefahr, daß die so erhaltenen Proteine nicht intakt bleiben und bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese keine definierten Banden mehr bilden.

Angesichts dieser Einschränkung sowie in Anbetracht der geringen Effizienz der beschriebenen alternativen Ablösemethoden wurde für die folgenden Versuche die in Kap.2.3.1

beschriebene Methode zur Ablösung der adhärenten Komponenten eingesetzt.

2.4. Kontrolle der unspezifischen Adsorption von Mediumkomponenten am Substrat

Die untersuchten, adhärent oder in Suspension wachsenden Zellinien bedürfen zu ihrem Wachstum des Zusatzes von Serum (Fötales Kälberserum) im Kulturmedium. Eine Analyse der adhärenten Komponenten an künstlichen Substraten muß also unter diesen Bedingungen Anteile aus zwei unterschiedlichen Quellen berücksichtigen:1) Substrat-adhärentes Material, welches die Zellen aktiv synthetisieren und zur Adhäsion benutzen, und 2) Medium-Bestandteile, die aus dem serumhaltigen Kulturmedium am Substrat adsorbiert werden. Mehrere experimentelle Ansätze zeigen, daß Serum-Komponenten sich tatsächlich an der Substratoberfläche adsorbieren und das metabolische Verhalten der Zellen während des adhärenten Wachstums beeinflussen (37-39, 60, 69-71). Darüberhinaus haben die chemischen und strukturellen Eigenschaften des Substrats grundsätzlich Einfluß auf die Adhäsion. So spielen neben der Größe und Form des Substrats vor allem dessen Benetzbarkeit und elektrische Ladung eine Rolle (26, 31, 72-76). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plastik-Kulturgefäße werden ja erst durch spezielle Oberflächenbe-

handlung benetzbar und für adhärent wachsende Zellkulturen brauchbar gemacht. Bei dieser Oberflächenbehandlung entstehen für die Adhäsion wichtige negativ geladene Carbonylgruppen, ebenso ungesättigte Gruppen und möglicherweise Peroxide.

Bei Glas als Substrat ist eine Abhängigkeit der Adhäsion vom Typ des verwendeten Glases und dessen Ladungseigenschaften bekannt (72).

Angesichts dieser Tatsachen war es bei den vorliegenden Versuchen von Interesse festzustellen, ob die Verwendung unterschiedlicher Substrate (Glas, Plastik) als Gefäße für die Gewebekultur Einfluß auf die Art und Menge der adhärenten Komponenten hat.

2.4.1. Unspezifische Adsorption von Mediumkomponenten am Glas-Substrat

Im vorliegenden Kontrollversuch wurden die Bedingungen exakt simuliert, die für die Versuche unter Beteiligung von Zellen gelten.
Dazu wurden die gläsernen Gewebekulturgefäße (Roux-Schalen) insgesamt 60 Stunden bei 37°C mit serumhaltigem Kulturmedium (80 ml/Schale) inkubiert; das Kulturmedium wurde dabei nach 20 und 40 Stunden Inkubation dekantiert und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach beendigter Inkubation

wurde das Kulturmedium abgegossen und die Roux-Schalen 2 mal mit je 10 ml vorgewärmtem (37°C) PBS vorsichtig nachgewaschen. Danach wurden, zur Simulation einer Zellablösung, die Roux-Schalen 30 Minuten bei 37°C mit 0.5 mM EGTA, 2 mM PMSF in PBS (je 20 ml/Roux-Schale) auf einer Schüttelapparatur mit 120 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Lösungen dekantiert und die Kulturgefäße noch 4 mal vorsichtig mit der Pufferlösung (0.5 mM EGTA, 2 mM PMSF in PBS), je 10 ml/Roux-Schale, abgespült.

Die Ablösung des noch am Substrat haftenden Materials erfolgte nach der in Kap.2.3.1 beschriebenen stufenweisen Elution mit SDS-haltigen Puffern bei 37°C und 80°C. Die Eluate wurden nach erschöpfender Dialyse lyophilisiert und geeignete Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Abb.4, A-D,(S.26) zeigt das Proteinmuster (nach Anfärbung mit Coomassie brilliant blue R 250) der dialysierten, elektrophoretisch aufgetrennten Komponenten, die durch Adsorption von Serum-Bestandteilen als Substrat-adhärent gefunden werden. Als Hauptbestandteil sieht man ein Protein mit Molekulargewicht 68 Kd, daneben mindestens 7 weitere Proteine mit Molekulargewichten von 22, 36, 82, 135, 195, 220 und 240 Kd (Molekulargewichtsbestimmung: s. Mat. u. Meth.).

Bei dem 68 Kd-Protein dürfte es sich um Rinderserumalbumin (RSA)

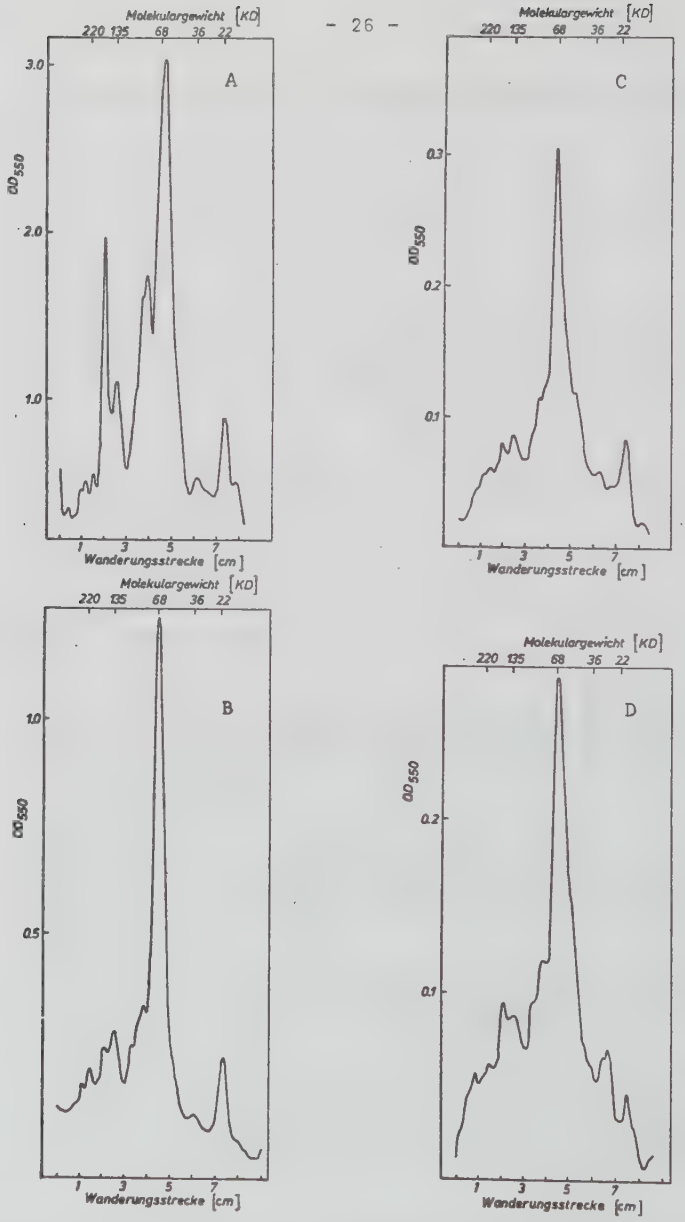

Abb.4,A-D. Densitometer-Diagramme nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Substrat-adhärenten Materials von Serum-haltigem Medium ohne Beteiligung von Zellen. Substrat: Glas.
A-D: 1.-4. Elution.

handeln (mit Schulter zur niedermolekularen Seite hin), bei den 135 Kd- und 195 Kd-Molekülen möglicherweise um RSA-Oligomere. Culp (44) findet nach ähnlichem Elutionsprinzip ebenfalls ein solch heterogenes Proteinmuster mit einem Hauptprotein, das mit RSA elektrophoretisch identisch ist.

Das Muster der adhärenten Proteine ändert sich in der Reihenfolge der Elutionen zwar kaum in der qualitativen Zusammensetzung, doch zeigen sich erhebliche Unterschiede in den Anteilen der einzelnen Proteine. Die Hauptkomponente (68 Kd) ist in jedem Eluat gleichbleibend sehr stark vorhanden, was sowohl für einen großen Anteil dieser Komponente am adhärenten Material als auch für deren ausgeprägte Adhäsivität spricht. Vergleicht man dagegen die Eluate in Abb.4 A und B, die zwar nacheinander, aber mit der gleichen Pufferlösung unter identischen Bedingungen (30 Min., 37°C) erhalten wurden, so fällt vor allem der Rückgang der Proteine mit 82 und 195 Kd Molekulargewicht im 2. Eluat auf. Zwei weitere Elutionen des Glas-Substrats mit 1% SDS, 1% Mercaptoäthanol bei höherer Temperatur (80°C, 3 Min.) enthalten diesselben Proteine , wie sie schon in den vorhergehenden Eluaten auftraten. Die letzte Elutionsstufe jedoch (Abb.4, D) bringt eine Veränderung bei Proteinen kleineren Molekulargewichts: Das Protein mit 22 Kd Molekulargewicht hat im 4. Eluat stark abgenommen, während der Anteil des

Proteins mit 36 Kd Molekulargewicht deutlich größer ist als bei allen vorangegangenen Elutionen.

Eine quantitative Beschreibung der stufenweise eluierten, substrat-adhärenten Proteine gibt Tab.2:

	µg Protein/cm^2
1.Elutionsstufe	0.75
2.Elutionsstufe	0.45
3.Elutionsstufe	0.20
4.Elutionsstufe	0.10

Tab.2.Elutionsverhalten adhärenter Serum-Komponenten nach Inkubation von serumhaltigem Kulturmedium in Roux-Schalen (Glas-Substrat). Elution: s.Kap.2.3.1.

Demnach nimmt die Menge der in einer Elutionsstufe vom Substrat ablösbaren Serumkomponenten in der Reihenfolge der Elutionsstufen deutlich ab: Mehr als zwei Drittel der insgesamt eluierbaren Proteine lassen sich in den ersten beiden Elutionsstufen gewinnen, wobei im ersten Ablöseschritt klar mehr an Ausbeute als im zweiten erhältlich ist. Auch in der 3. und 4. Elutionsstufe sind noch erhebliche Mengen an Substrat-adhärentem Material ablösbar, während sich mit einer 5. Elution mit 0.1 N NaOH keine nachweisbaren Mengen an Proteinen mehr ablösen lassen. Insgesamt beträgt die

Ausbeute der Glas-adhärenten Serumproteine 1.5 $\mu g/cm^2$ Glasoberfläche.

Das Proteinmuster der adhärenten Serumkomponenten ist im Übrigen weitgehend analog demjenigen, das im Überstand des inkubierten Kulturmediums (ohne Beteiligung von Zellen) gefunden wird (Abb. 5). Bei den adhärenten Medium-Proteinen findet man zusätzlich lediglich ein Protein mit 22 Kd Molekulargewicht.

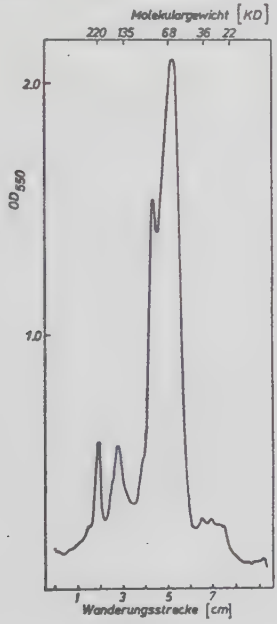

Abb.5. Densitometer-Diagramm nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen im Kulturmedium ohne Beteiligung von Zellen (Anfärbung mit Coomassie brilliant blue R 250).

2.4.2. Unspezifische Adsorption von Mediumkomponenten am Plastik-Substrat

Die Bedingungen der Inkubation von Plastik-Gewebekulturgefäßen (Falcon-dish) mit serumhaltigem Medium und die anschließende Eluierung des Substrat-adhärenten Materials erfolgten wie beschrieben (Kap.2.3.1), mit dem Unterschied zum vorhergehenden Abschnitt, daß nun Kulturgefäße aus Plastik statt gläsernen verwendet wurden.

Die Abbildung 6, A-D (S.31) zeigt die dialysierten, elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach Coomassie brilliant blue R 250-Anfärbung, die durch Adsorption von Serum-Bestandteilen adhärent am Plastik-Substrat gefunden wurden. Das Proteinmuster weist nahezu die gleichen Komponenten auf, wie sie auch am Glas-Substrat gefunden werden: Neben einer Hauptkomponente mit 68 Kd findet man noch mindestens 7 weitere Proteine zwischen 22 und 240 Kd Molekulargewicht. Eine quantitative Beschreibung der Elution adhärenter Komponenten vom Plastik-Substrat liefert Tab.3 (S.32).

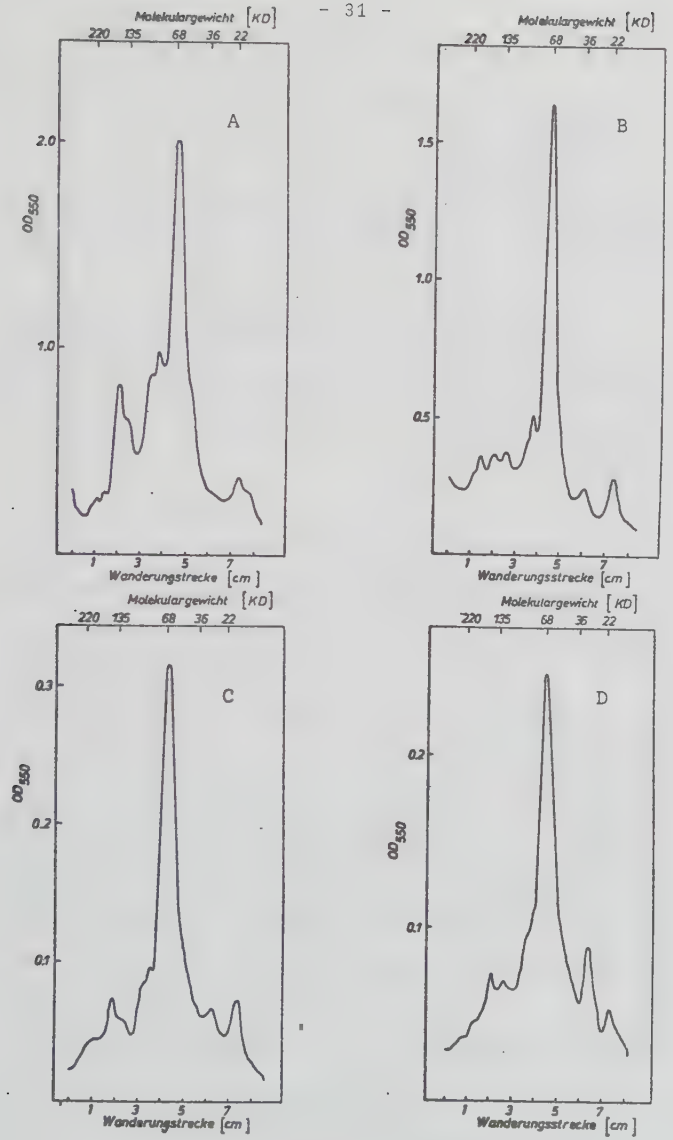

Abb.6,A-D. Densitometer-Diagramme nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Substrat-adhärenten Materials von Serum-haltigem Medium ohne Beteiligung von Zellen.Substrat: Plastik. A-D: 1.-4. Elution.

	µg Protein/cm^2
1.Elutionsstufe	0.6
2.Elutionsstufe	0.4
3.Elutionsstufe	0.1
4.Elutionsstufe	0.1

Tab.3. Elutionsverhalten adhärenter Serum-Komponenten nach Inkubation von serumhaltigem Kulturmedium in Plastik-Gewebekulturgefäßen (Falcon-dish).Elution:s.Kap.2.3.1.

Vergleicht man die unspezifische Adsorption von Serum-Komponenten an Glas- und Plastik-Substraten miteinander, so zeigt die qualitative Analyse der jeweiligen adhärenten Proteine eine auffallende Übereinstimmung. Dies läßt sich besonders gut anhand der Abb.7 (S.33) feststellen, bei der die Proteinmuster jeder Elutionsstufe für beide Substratarten direkt übereinander gezeichnet sind.

Demnach adsorbieren Proteine aus dem serumhaltigen Kulturmedium gleichermaßen an den verwendeten Gewebekulturgefäßen aus Glas und Plastik, zumindest jedenfalls in Bezug auf die Zusammensetzung der gefundenen Proteine.

Allerdings zeigt der quantitative Vergleich zwischen Glas- und Plastik-Substrat, daß an Glas erheblich mehr Serumproteine pro Flächeneinheit anhaften als an Plastik.

Die Abnahme der vom Substrat mit jedem Elutionsschritt ab-

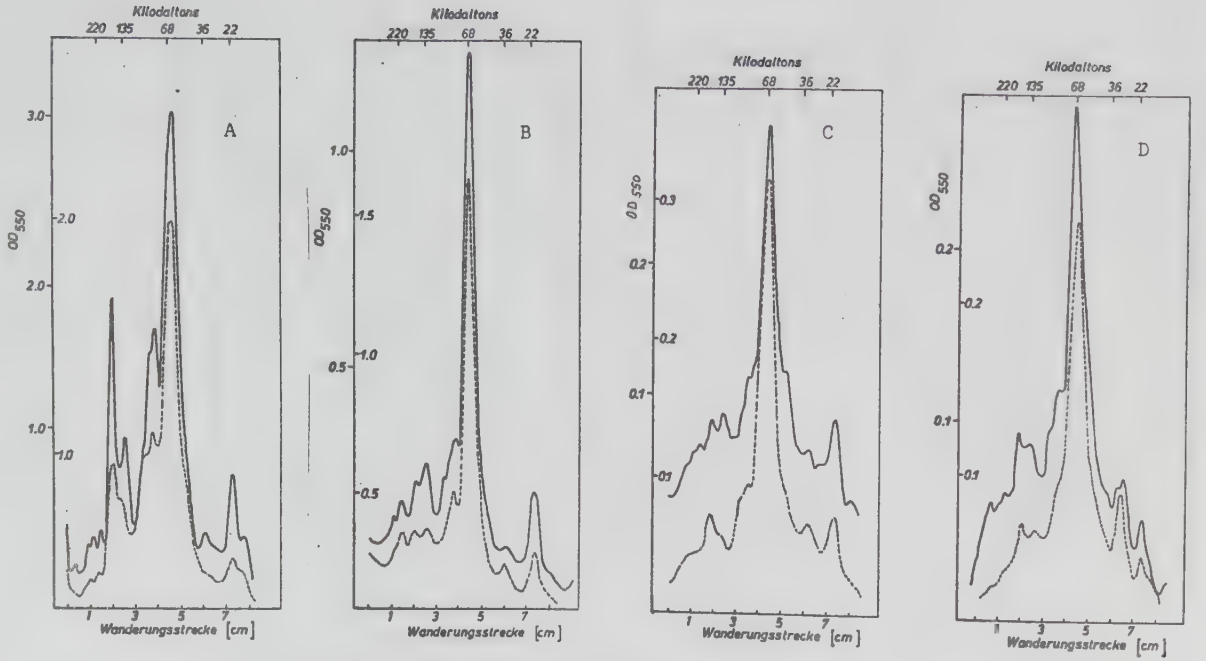

Abb.7, A-D. Vergleich der Densitometer-Diagramme nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Substrat-adhärenten Materials von Serum-haltigem Medium ohne Beteiligung von Zellen.———: Glas-Substrat, ----: Plastik-Substrat.
A-D: 1.-4.Elution.

lösbaren Serum-Komponenten verläuft dagegen bei Plastik-Substrat praktisch identisch mit derjenigen bei Clas-Substrat.

2.5. Kontrolle der unspezifischen Adsorption von radioaktiv markierten Vorstufen am Substrat

Durch unspezifische Adsorption haftet unter den vorliegenden Versuchsbedingungen eine Reihe von Serumproteinen am Substrat, und es bleibt offen, ob auch eine sekundäre Adsorption von niedermolekularen Stoffen an unspezifisch adhärente Serumproteine stattfinden kann.
Bei den Versuchen zur Charakterisierung adhärenter Zellstrukturen sollten nun aber durch das Angebot und den Einbau radioaktiver Vorstufen diejenigen hochmolekularen Komponenten charakterisiert werden, welche die Zellen zur a k t i v e n Adhäsion neu synthetisiert hatten. Daher war es wichtig, zunächst sicherzustellen, daß in Substrat-adhärentem Material wiedergefundene radioaktive Markierungen nicht einer unspezifischen Adsorption der angebotenen radioaktiven Vorstufen an das Substrat oder einer sekundären Bindung an adhärente Medium-Komponenten zuzuschreiben sind.

Dazu wurden Glas- und Plastik-Kulturgefäße (Roux-Schalen, Falcon-dishes) unter den Bedingungen der Versuche inkubiert, die zur Charakterisierung der aktiven Adhäsion bei verschie-

denen Zellinien dienten (s.Kap.3).

Als radioaktive Vorstufen wurde den Kulturmedien ^{14}C-Leucin, ^{3}H-Fucose oder γ-(^{32}P)-ATP entsprechend den Bedingungen der Versuche mit Zellbeteiligung zugesetzt und in den Kulturgefäßen inkubiert. Das Substrat-adhärente Material aus diesen Inkubationen wurde, wie in Kap.2.3.1 beschrieben, gewonnen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Unter diesen Bedingungen konnte weder in den Gelen nach der Elektrophorese noch in den zur Elektrophorese aufgetragenen Proben des Substrat-adhärenten Materials Radioaktivität gefunden werden.Demnach werden alle niedermolekularen, dialysablen radioaktiven Komponenten im Verlauf der Aufarbeitung des Substrat-adhärenten Materials entfernt und bilden keine Kontamination der zur Elektrophorese kommenden Proben mehr.

Man kann daher davon ausgehen, daß die gesamte im Substrat-adhärenten Material nach aktiver Adhäsion von Zellen gefundene Radioaktivität, insbesondere die im Trennbereich der Elektrophorese-Gele auftretende, aus höhermolekularen Strukturen stammt, welche die Zellen während der Inkubation in den Kulturgefäßen aus den niedermolekularen Vorstufen synthetisiert haben.

2.6. Kontrolle der ins Kulturmedium sezernierten Zellkomponenten

Bei der Beantwortung der Frage nach der Herkunft und Spezifität von Substrat-adhärentem, aktiv von Zellen synthetisiertem Material muß man die Möglichkeit beachten, daß dieses Material nicht nur an spezifischen Kontaktpunkten zwischen Zelle und Substrat deponiert, sondern eventuell primär von den Zellen in das sie umgebende Kulturmedium abgegeben wird, von wo diese sezernierten Substanzen dann anschließend sekundär am Substrat adsorbiert werden und eine spezifische, aktive Adhäsion der Zellen am Substrat vermitteln oder nur unspezifisch adsorbiert werden.

Um diese Möglichkeit des Entstehens von Substrat-adhärenten Zellkomponenten zu untersuchen, wurden zwei Zellinien analysiert: Adhärent wachsende STU-D17-Zellen und in Suspension wachsende STU51A/232B-Zellen. Bei dem letzteren Zellsystem war festzustellen, ob und in welcher Art und Menge Substanzen ins Kulturmedium sezerniert werden, ohne daß eine Zell-Substrat-Adhäsion vorliegt. Damit bot dieses Suspensionssystem einen direkten Vergleich mit adhärent wachsenden Zellen der gleichen Zellinie und deren Komponenten, die als spezifische Substrat-adhärente Strukturen gefunden werden.

2.6.1. Zellkomponenten im Kulturmedium von adhärent wachsenden STU-D17-Zellen

STU-D17-Zellen wurden in Roux-Schalen mit einer Zelldichte von ca. 1 x 10^6 Zellen/ml in Dulbecco's Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum während 60 Stunden bei 37°C mit insgesamt 1.5 mCi ^{3}H-Fucose und 250 µCi ^{14}C-Leucin inkubiert. Nach der Beendigung der Inkubation wurde das Kulturmedium von den Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (s.Kap. Mat. u.Meth.) und sein hochmolekularer Anteil nach erschöpfender Dialyse gegen bidestilliertes Wasser und Lyophilisation mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in die einzelnen Komponenten aufgetrennt.

Es zeigte sich, daß die Menge der im hochmolekularen, nichtdialysablen Anteil des Kulturmediums befindlichen Radioaktivität für ^{3}H-Fucose und ^{14}C-Leucin bei 0.1% der angebotenen Radioaktivität liegt. Dieser Anteil zeigt im aufgetrennten Elektrophorese-Gel kein differenziertes Muster radioaktiv markierter Proteine und Glykoproteine auf (ohne Abb.). Es liegt daher nahe, diese Radioaktivität einer unspezifischen Bindung an Serumproteine zuzuschreiben. Offensichtlich werden also von adhärent wachsenden STU-D17-Zellen keine spezifischen Komponenten ins Kulturmedium sezerniert, die zur Adhäsion dieser Zellen am Substrat beitragen.

2.6.2. Zellkomponenten im Kulturmedium von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur

STU51A/232B-Zellen wurden 60 Stunden bei 37°C in Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum in Suspensionskultur inkubiert. Die Zellzahl betrug nach 60 Stunden Inkubation 8×10^9 Zellen. Die radioaktive Markierung erfolgte mit ^{3}H-Leucin (5 µCi/ml), als Kulturgefäße dienten Glasflaschen (1 l Vol.). Nach Beendigung der Inkubation wurde das Kulturmedium analog Kap.2.6.1 von den Zellen getrennt und sein hochmolekularer Anteil analysiert.

Auch bei dieser Zellinie befand sich von der angebotenen Radioaktivität ca. 80% im zellfreien Überstand, und von dieser Radioaktivität blieben nur 0.5% im nicht-dialysablen, hochmolekularen Anteil, d.h. mehr als 99% der von den Zellen nicht verwerteten radioaktiven Vorstufen waren im Medium noch als niedermolekulare Komponenten vorhanden.

Die elektrophoretische Auftrennung des hochmolekularen Mediumüberstandes zeigt Abb.8 (S.39): Neben einem undifferenzierten Hintergrund von verschiedenen ^{3}H-Leucin-markierten Proteinen zwischen 10 und mehr als 300 Kd Molekulargewicht fallen lediglich zwei ^{3}H-Leucin-markierte Proteine mit 25 und 68 Kd Molekulargewicht durch deutliche radioaktive Markierung auf.

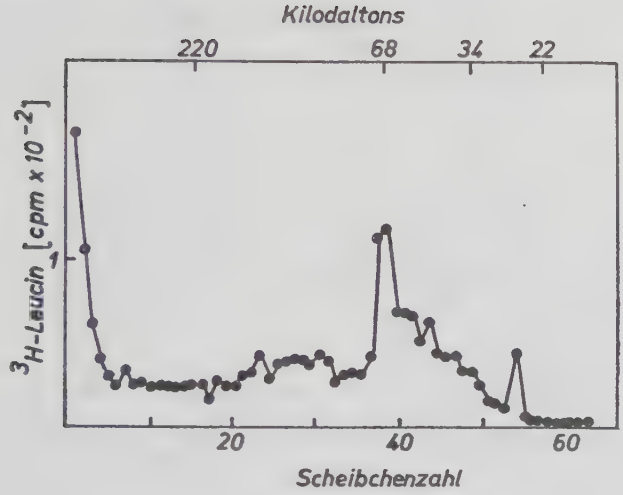

Abb.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der ^{3}H-Leucin-markierten Proteine im Kulturmedium nach Inkubation (60 Std.) mit STU51A/232B-Zellen.

Im Vergleich zu den in Adhäsion gewachsenen STU-D17-Zellen läßt sich also zwar in der Menge der im Kulturmedium befindlichen, hochmolekular gebundenen Radioaktivität kein wesentlicher Unterschied feststellen (STU51A/232B: 0.5%, STU-D17: 0.1% der angebotenen Radioaktivität), jedoch sezernieren möglicherweise die in Suspension wachsenden STU51A/232B-Zellen geringe Mengen von Proteinen, die in der elektrophoreti-

schen Auftrennung signifikant markiert erscheinen. Dagegen sind solche bei adhärent wachsenden STU-D17-Zellen eventuell aufgrund der unzureichenden Masse an nachweisbaren Proteinen nicht festzustellen.

3. Charakterisierung der adhärenten Zellkomponenten

3.1. Densitometrische Analyse nach der elektrophoretischen Auftrennung

Frisch ausgesäte STU-D17-Zellen wurden, wie in Kap.1.3 beschrieben, auf Glas- und Plastik-Kulturgefäßen (Roux-Schalen, Falcon-dishes) bis zu einer Dichte von ca. 80% Konfluenz inkubiert. Nach Ablösen der Zellen (s.Kap.2.2.1) wurden die adhärenten Komponenten sequentiell vom Kultursubstrat eluiert (s.Kap.2.3.1) und geeignete Proben der adhärenten Komponenten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.1.1. Adhärente Proteine am Glas-Substrat

Das Ergebnis der Elution adhärenter Proteine vom Glas-Substrat zeigt Abb.9; auf ihr sind die densitometrischen Auswertungen der Coomassie brilliant blue R250-gefärbten, elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden zu sehen (S.41). Bei den gegebenen Versuchsbedingungen muß man die Tatsache

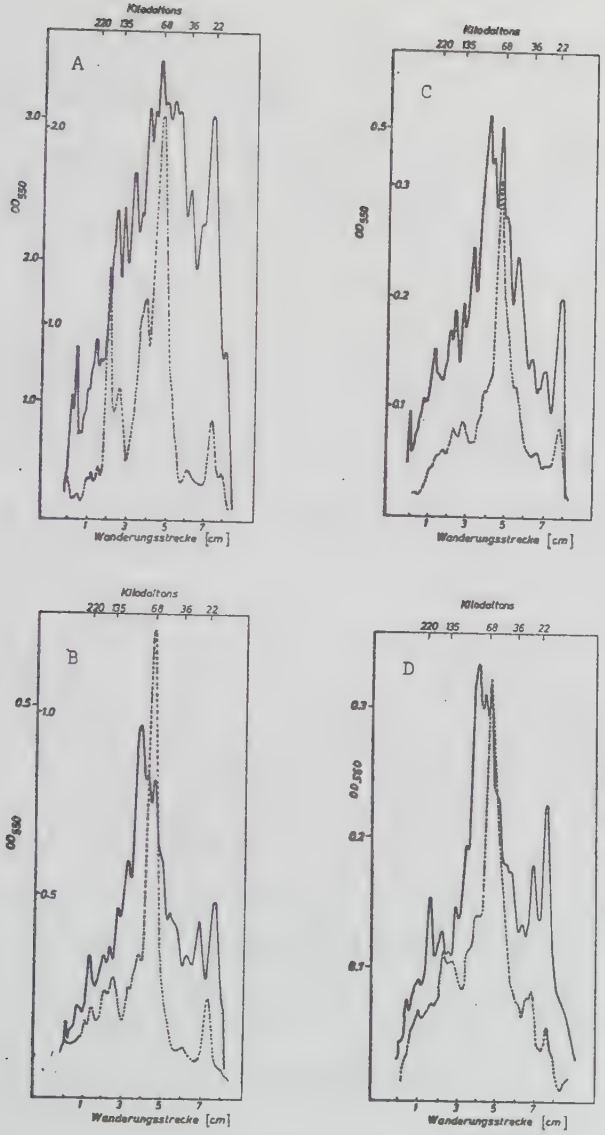

Abb.9,A-D. Legende siehe Seite 42.

Abb.9,A-D. Densitometer-Diagramme nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Substrat-adhärenten Proteinen (Coomassie brilliant blue R 250-Färbung)(———). Zellinie: STU-D17, Substrat: Glas.(----:Substrat-adhärente Serumproteine,s.Abb.4). A-D:1.-4. Elution.

Berücksichtigen, daß sich unter den in Abb.9 abgebildeten Proteinmustern neben zellulären Proteinen auch die unspezifisch am Substrat haftenden Serumproteine befinden. Daher sind die Proteinmuster der Komponenten, die sich ohne Beteiligung von Zellen am Substrat anhaften und analog den adhärenten Zellproteinen ablösen lassen (s.Kap.2.4.1), bei Abb.9 getüpfelt aufgetragen.

Die Eluate der adhärenten Proteine bestehen demnach, zumindest was ihren Coomassie blue-färbbaren Anteil ausmacht, aus einem sehr heterogenen Muster von ca. 17-25 Proteinen, die auf den ganzen Trennbereich der Gele verteilt sind und aufgrund ihrer dichten Folge im Gel vom Densitometer-Schreiber nur unvollständig getrennt werden. Im Vergleich mit den adhärenten Serumproteinen (getüpfelte Kurven in Abb.9) fallen eine ganze Reihe zusätzlicher Proteine auf. Diese zusätzlichen Proteine sind also wohl zellulären Ursprungs und entstammen den Adhäsionsstellen zwischen Zellen und Substrat.
Besonders im niedermolekularen Bereich treten starke zellspezifische Banden auf (22, 32, 36-50 Kd), aber auch über

70 Kd Molekulargewicht sind einige Zellproteine dem Serumprotein-Muster überlagert.

Die qualitative Zusammensetzung der eluierten adhärenten Proteine ändert sich in der Reihenfolge der Elutionsschritte kaum. Jeder Elutionsschritt löst eine Vielzahl von Proteinen ab, wobei in allen Eluaten annähernd die gleichen Komponenten vertreten sind. Auch der Wechsel der Elutionsbedingungen (Temperatur, Puffer) zwischen dem 2. und 3. Eluat (Abb.9, B und C) zeigt keine auffallende Veränderung in der Zusammensetzung der eluierten Proteine.

Dagegen zeigen sich in der quantitativen Verteilung der einzelnen adhärenten Proteine Unterschiede in der Reihenfolge der Elutionsschritte: Im Molekulargewichtsbereich über 80 Kd nimmt der Anteil dieser Proteine an den Eluaten immer mehr ab, während vor allem der Anteil von Komponenten im Bereich von 18-25 Kd offensichtlich eher zunimmt im Verlauf der Elution. Dies spricht für eine stärkere Adhäsionsfähigkeit der niedermolekularen Komponenten im Verhältnis zu den höhermolekularen Proteinen.

Der Vergleich mit dem Proteinmuster der isolierten Plasmamembranen (Abb.10, S.44) zeigt, daß die in der Plasmamembran gefundenen Proteine praktisch alle auch in den Eluaten der Substrat-adhärenten Komponenten auftreten. Dabei besteht vor allem zwischen dem Proteinmuster des 1.Eluats der adhären-

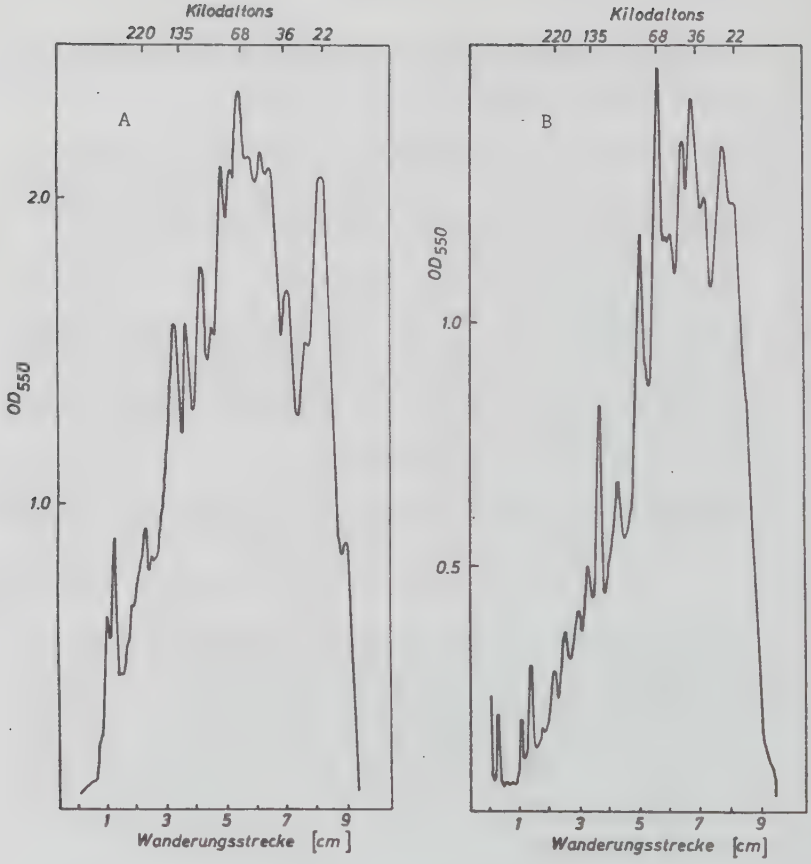

Abb.10,A u. B. Densitometer-Diagramme nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Coomassie brilliant blue R 250-Färbung) von A:1.Eluat der Substrat-adhärenten Proteine von STU-D17-Zellen am Glas-Substrat, und B: Isolierten Plasmamembranen von STU-D17-Zellen.

ten Komponenten und demjenigen der Plasmamembran eine auffallende Übereinstimmung in der qualitativen Zusammensetzung. Lediglich einige Proteine im Molekulargewichtsbereich von ca. 80-140 Kd scheinen in der Plasmamembran relativ weniger stark vertreten zu sein als im 1.Eluat der adhärenten Komponenten.

3.1.2. Adhärente Proteine am Plastik-Substrat

Die densitometrischen Diagramme der von Plastik-Substrat eluierten, elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sind in Abb.11 (S.46) wiedergegeben. Auch hierbei ist, wie vor allem Abb.11 A zeigt, eine Vielzahl von eluierten Proteinen im gesamten Trennbereich der Gele zu finden. Die Auflösungskapazität des Densitometerschreibers war leider nicht imstande, die in Abb.11 B-D besonders eng beieinanderliegenden Proteinbanden aufzutrennen.

Dennoch läßt sich sagen, daß im Vergleich zur Elution adhärenter Proteine von Glas-Substrat (s.Abb.9) keine nennenswerten Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der abgelösten Proteine festzustellen sind.

Sowohl von Glas- wie von Plastik-Substrat lassen sich also, zusätzlich zu den aus dem Serum stammenden Proteinen, eine Reihe zellulärer Proteine ablösen. Einen direkten Nachweis

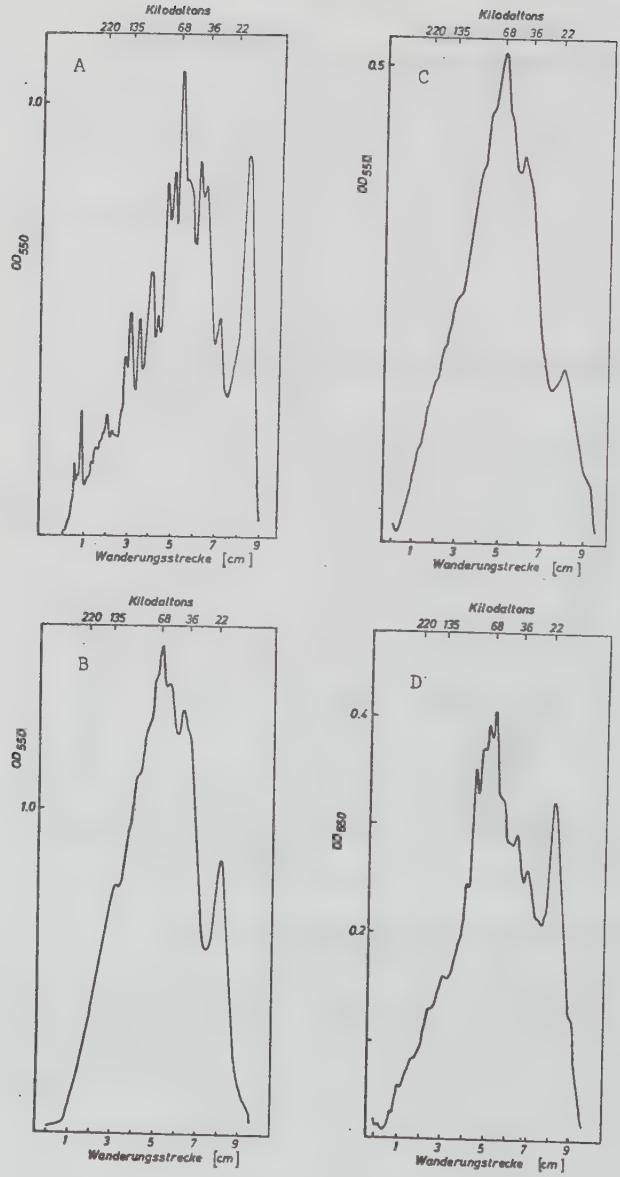

Abb.11, A-D. Legende siehe Seite 47

Abb.11, A-D. Densitometer-Diagramme nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Substrat-adhärenten Proteinen (Coomassie brilliant blue R 250-Färbung). Zellinie: STU-D17, Substrat: Plastik. A-D: 1.-4.Elution.

ihres Zellursprungs kann aber nur der Beweis einer de novo-Synthese durch die Syntheseapparate der Zellen liefern. Ein Verzicht auf Serum-Zusatz im Kulturmedium zur Verhinderung der Adhäsion nicht-zellspezifischer Komponenten kommt nicht in Frage, da Serumproteine durch ihre Adsorption an den Substraten eine passive, unspezifische Adhäsion von Zellen verhindern. Andererseits ist eine vermittelnde, essentielle Rolle von solchen adhärenten Serum-Komponenten bei der aktiven, spezifischen Adhäsion von Zellen an einem künstlichen Substrat unter physiologischen Bedingungen bekannt (29, 33, 77-81).

3.2. Charakterisierung der adhärenten Zellkomponenten durch de novo-Synthese

Um den Nachweis des zellulären Ursprungs von adhärenten Komponenten zu führen, wurden im Folgenden verschiedene radioaktiv markierte, niedermolekulare Vorstufen mit den Zellen inkubiert. Der Einbau dieser radioaktiv markierten Verbindungen in höhermolekulare Zellstrukturen und das Auffinden der radioaktiven Markierungen in den eluierten adhärenten Komponenten sollte dann Hinweise auf die Art und Zusammensetzung dieser zellulären, an der Substrat-Adhäsion beteiligten Strukturen geben.

3.2.1. Markierung der adhärenten Zellproteine mit radioaktivem Leucin

Die Zellen wurden zum Nachweis des Proteincharakters der adhärenten Komponenten mit ^{14}C- oder ^{3}H-Leucin inkubiert. Als Aminosäure wurde Leucin gewählt, weil es sich durch einen relativ geringen metabolischen Umsatz auszeichnet.

Zur Kontrolle der Identität der eingebauten radioaktiven Markierung wurde mittels quantitativer Auswertung von Proteinhydrolysaten durch Aminosäure-Analyse (s.Kap. Mat. u. Meth.) und anschließender Szintillationszählung festgestellt, daß die eingebaute Radioaktivität in den Proben der eluierten adhärenten Proteine sich ausschließlich in der Leucin-Fraktion befand.

Unter Verwendung der STU-D17-Zellinie sollte zunächst der Einfluß der chemischen Natur der Kulturgefäße auf die Zusammensetzung der Substrat-adhärenten, zellulären Strukturen untersucht werden. STU-D17-Zellen wurden daher auf Glas- und Plastik-Substraten (Roux-Schalen, Falcon-dishes) angezüchtet.

3.2.1.1. ^{14}C-Leucin-markierte Proteine von STU-D17-Zellen am Glas-Substrat

Zur Inkubation mit ^{14}C-Leucin wurden STU-D17-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase frisch ausgesät und wie beschrieben (Kap.1.3) 60 Stunden bei 37°C gehalten. Das Kulturmedium enthielt während der Inkubation der Zellen insgesamt 0.3 µCi/ml ^{14}C-Leucin, bei einer Gesamtkonzentration von 1 mM Leucin.

Nachdem die Zellen am Ende der Inkubation schonend und vollständig vom Glas-Substrat abgelöst waren, wurden die noch am Substrat haftenden Komponenten stufenweise eluiert (s. Kap.2.3.1) und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Auftrag betrug pro Gel jeweils ca.100 µg Protein.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der eluierten Komponenten zeigt Abb.12 (S.50), während Abb.13 (S.51) die

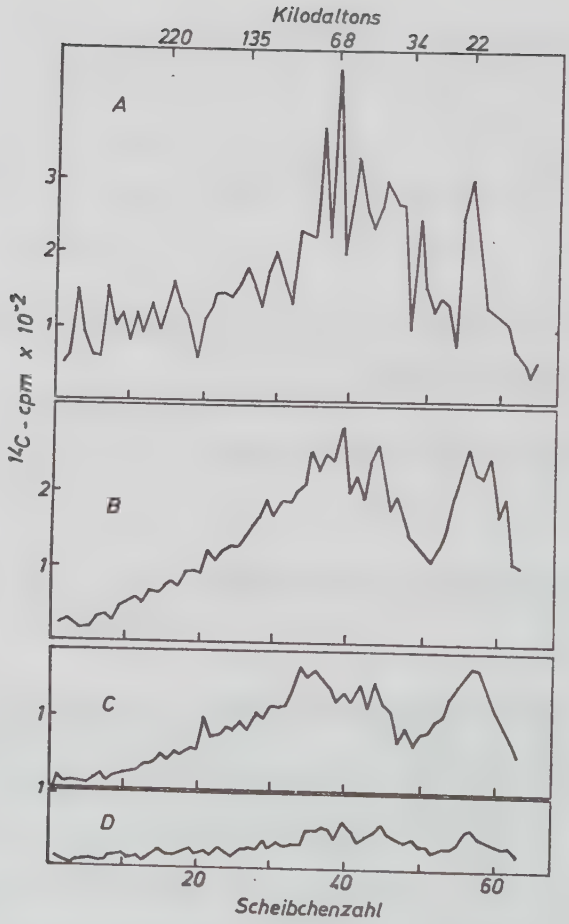

Abb.12, A-D. Verteilung der ^{14}C-markierten Proteine in den Substrat-adhärenten Komponenten von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Substrat: Glas. A: 1.Elution, B: 2.Elution, C: 3.Elution, D: 4.Elution. Markierung: ^{14}C-Leucin

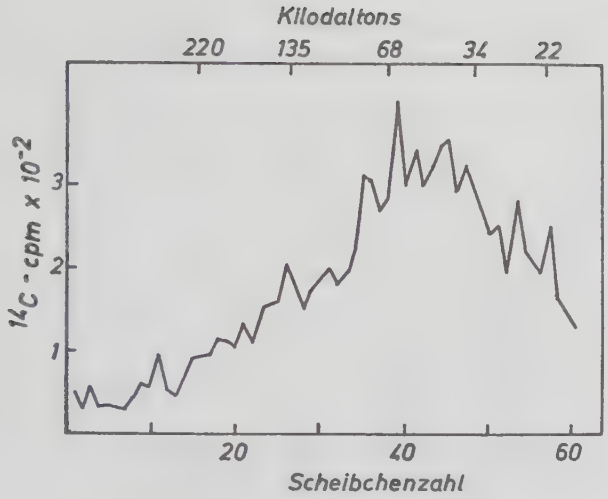

Abb.13. Verteilung der ^{14}C-Leucin-markierten Proteine in der Plasmamembran von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

entsprechende Markierung in den isolierten Plasmamembranen der gleichen Zellen zeigt.

Demnach finden sich ^{14}C-Leucin-markierte, neu synthetisierte Zellproteine in der Plasmamembran und den adhärenten Komponenten über den gesamten Trennbereich der Gele verteilt. Die Zahl der auftrennbaren Proteinbanden beträgt mindestens 20. Der Hauptanteil dieser Proteine liegt bei den adhärenten Komponenten, im Gegensatz zur Plasmamembran, in zwei deutlich

voneinander abgesetzten Molekulargewichtsbereichen vor, nämlich zwischen 18-25 Kd und ca. 30-100 Kd, mit einem ausgeprägten Minimum dazwischen. Die beiden ersten Eluate (Abb.12,A u. B) lassen keinen Unterschied in der qualitativen Zusammensetzung des radioaktiven Proteinmusters erkennen. Auch im 3.Eluat scheinen diesselben Proteine vorhanden zu sein. Bemerkenswert ist jedoch die Tatsache, daß die spezifische Radioaktivität der adhärenten Proteine (cpm/100 µg Proteinauftrag) insgesamt in der Reihenfolge der Elutionsstufen abnimmt. Im 4.Eluat ist die spezifische Radioaktivität der Proteine so gering, daß im Elektrophorese-Gel keine deutliche Auftrennung der einzelnen Proteine zu erhalten ist.

Auffallend bei der Betrachtung der unterschiedlichen Adhäsionsfähigkeit der einzelnen Proteine ist der Bereich von 18-25 Kd Molekulargewicht, in dem die ^{14}C-Leucin-markierten Proteine deutlich fester und damit länger am Glas-Substrat haften (Abb. 12,A-C). Dies äußert sich in der Zunahme ihres Anteils in der Reihenfolge der Elution. Offensichtlich handelt es sich bei diesen kleineren zellulären Proteinen um Komponenten mit besonders großer Adhäsionskapazität am Glas-Substrat. Außerdem fällt im Vergleich mit dem Proteingehalt dieses Molekulargewichtsbereichs in den Eluaten (s.Abb.9) auf, daß sich die spezifische Radioaktivität der niedermolekularen adhärenten Proteine im Verlauf der Elution dramatisch

ändert (Abb.14):

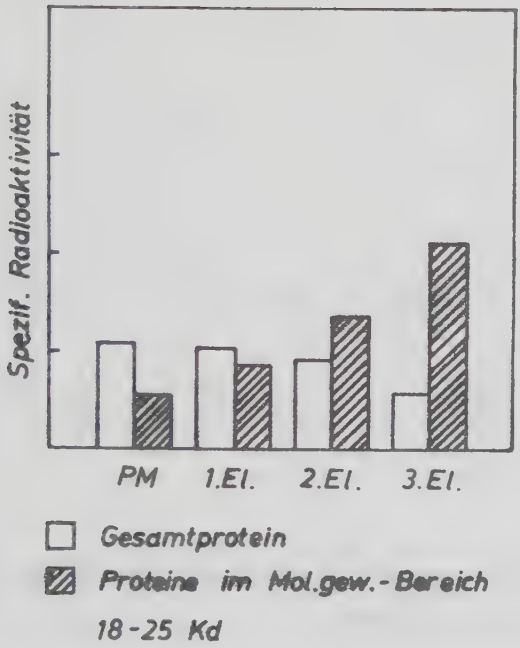

Abb.14. Spezifische Radioaktivität (^{14}C-Leucin-cpm/Proteinmasse) in Proteinen der Plasmamembran (PM) und den adhärenten Proteinen (1.-3.Eluat) von STU-D17-Zellen. Kulturgefäß: Roux-Schalen (Glas).

Während die adhärenten Proteine des Molekulargewichtsbereichs 18-25 Kd im 1.Eluat schon fast die doppelte spezifische Radioaktivität aufweisen, wie sie die Proteine dieser Größe in der Plasmamembran besitzen, ist ihre spezifische Radioaktivität im 2.Eluat noch wesentlich höher und steigt im 3.Eluat

noch mehr an. Im 3.Eluat liegt die spezifische Radioaktivität der Proteine des Molekulargewichtsbereichs 18-25 Kd ca. 3 mal höher als in der Plasmamembran. Gleichzeitig steigt das Verhältnis der spezifischen Radioaktivität im Bereich der 18-25 Kd-Proteine zu derjenigen im Gesamteluat mit zunehmender Elution stark an, insgesamt um den Faktor 8.

Demnach befinden sich in dieser Fraktion der Größe von 18-25 Kd Molekulargewicht Proteine, die sich einerseits durch besondere Adhäsionsfähigkeit vor anderen adhärenten Proteinen auszeichnen, und die außerdem während der Adhäsionsvorgänge in der logarithmischen Wachstumsphase von den Zellen bevorzugt synthetisiert worden sind.

3.2.1.2. ^{14}C-Leucin-markierte Proteine von STU-D17-Zellen am Plastik-Substrat

Analog zu den Bedingungen, wie sie in Kap.3.2.1.1 beschrieben sind, wurden STU-D17-Zellen in Plastik-Kulturgefäßen (Falcon-dishes) anstelle von Glasgefäßen mit ^{14}C-Leucin-haltigem Kulturmedium inkubiert und die adhärenten Proteine analysiert.

Die elektrophoretische Trennung der vom Plastik-Substrat eluierten adhärenten Zellproteine liefert ein Proteinmuster, das praktisch identisch ist in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung mit demjenigen vom Glas-Substrat (Abb.15, S. 55).

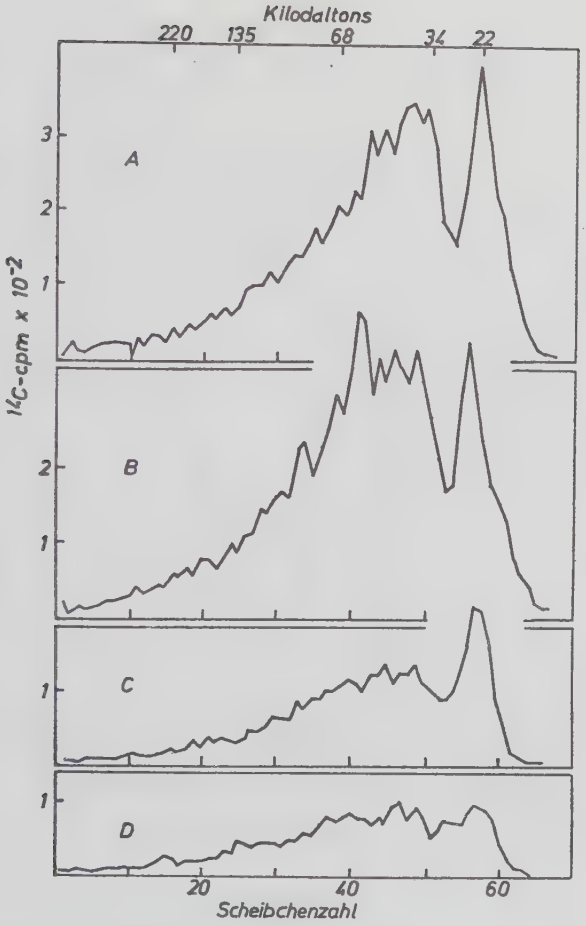

Abb.15,A-D. Verteilung der ^{14}C-Leucin-markierten Proteine in den Substrat-adhärenten Komponenten von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Substrat: Plastik. A: 1.Elution, B: 2.Elution, C: 3.Elution, D: 4.Elution.

Einige ^{14}C-Leucin-markierte Proteine liegen in dem Molekulargewichtsbereich zwischen 30-100 Kd, davon abgesetzt liegt wiederum ein stark markierter Bereich zellulärer Proteine bei 18-25 Kd. Die qualitative Zusammensetzung der radioaktiven Proteinmuster ändert sich im Verlauf der Elution nicht, wohl aber das Verhältnis der Proteine untereinander. Vor allem im dritten Eluat, also nach der Elution bei höherer Temperatur (80^{o}C), liegt der Anteil der radioaktiv markierten Proteine des Molekulargewichtsbereichs 18-25 Kd erheblich höher als bei den vorangegangenen Elutionen.

Hervorzuheben ist die Tatsache, daß wie schon bei den vom Glas-Substrat eluierten adhärenten Proteinen die spezifische Radioaktivität der Proteine insgesamt abnimmt in der Reihenfolge der Eluate, daß aber dagegen die spezifische Radioaktivität der kleineren Proteine (Molekulargewichtsbereich 18-25 Kd) mit zunehmender Elution stark ansteigt (Abb.16, S.57). Neben der hohen Adhäsionskapazität dieser kleinen Fraktion hebt sie sich also auch noch durch eine selektive Synthese während des adhärenten Wachstums der Zellen hervor.

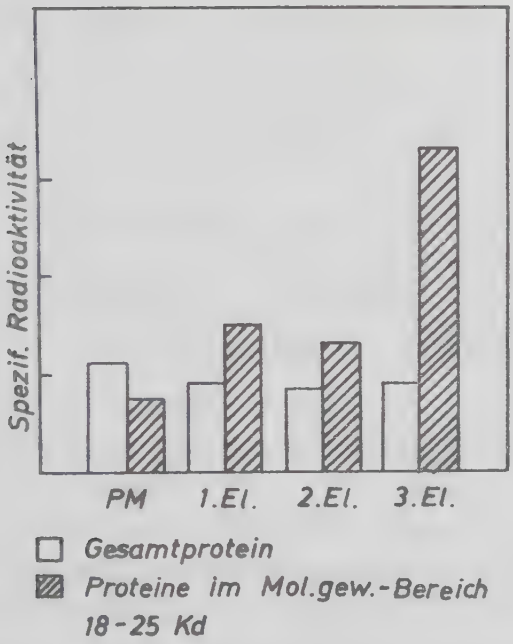

Abb.16. Spezifische Radioaktivität (^{14}C-Leucin-cpm/Proteinmasse) in Proteinen der Plasmamembran (PM) und den adhärenten Proteinen (1.-3.Eluat) von STU-D17-Zellen. Kulturgefäß: Falcon-dishes (Plastik).

3.2.1.3. ^{14}C-Leucin-markierte Proteine von STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur

Genau entsprechend den Versuchen mit den STU-D17-Zellen wurden die adhärenten Proteine von STU51A/232B-Zellen durch Inkubation der wachsenden Zellpopulation mit ^{14}C-Leucin-haltigem Kulturmedium untersucht, um mögliche Unterschiede in den Adhäsionskomponenten bei diesen beiden Zellinien festzustellen. Beide Zellinien entstammen derselben Zellpopulation embryonaler Mäusefibroblastenzellen, unterscheiden sich aber in der Natur des zu ihrer Transformation benutzten Virus(STU-D17: RSV, STU51A/232B: SV 40).

Diese beiden Zellinien lassen sich adhärent wachsend in Plattenkultur züchten. Die STU-D17-Zellen wachsen sogar ausschließlich in Plattenkultur, während die STU51A/232B-Zellen in der Plattenkultur eine merklich geringere Adhäsivität aufweisen als die STU-D17-Zellen. Aus diesen Gründen war es interessant zu klären, ob sich die adhärenten Proteinmuster der beiden Zellinien durch spezifische, virus-induzierte Proteine unterscheiden.

Die Bedingungen der radioaktiven Markierung mit ^{14}C-Leucin und die Elution der adhärenten Proteine waren wie in Kap. 3.2.1.1 beschrieben. Als Kulturgefäße wurden Roux-Schalen verwendet.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der adhärenten Proteine von STU51A/232B-Zellen zeigt Abb.17 (S.60) sowie Abb.18 (S.61). Die Eluate enthalten nach Abb.17 wiederum eine Vielzahl von radioaktiv markierten Proteinen zwischen 18 und ca. 150 Kd Molekulargewicht, wobei der niedermolekulare Bereich (18-25 Kd) eine ausgeprägte ^{14}C-Leucin-Markierung aufweist.

Die qualitative Zusammensetzung des 1. und 2. Eluats ist nahezu identisch. Der Anteil der niedermolekularen ^{14}C-Leucin-markierten Fraktionen am Gesamtmuster scheint dagegen im 2.Eluat etwas höher zu liegen als im 1.Eluat.

Der Wechsel der Elutionsbedingungen bringt, wie das 3.Eluat (Abb.17 C) zeigt, auch ein geringfügig verändertes Muster der radioaktiv markierten Proteine im Eluat mit sich: Alle Proteinbanden treten nahezu gleich stark auf, der niedermolekulare Bereich dominiert hier nicht wie in den vorhergegangenen Eluaten. Im 4. Eluat, das nur noch eine geringe spezifische Radioaktivität aufweist, sind keine präzisen Banden in der ^{14}C-Leucin-Verteilung mehr zu erkennen, doch scheint der größte Anteil der Proteine auch hier im niedermolekularen Bereich um 22 Kd zu liegen.

Im Vergleich zu den Proteinen der Plasmamembran (Abb.19, S.63) läßt sich bereits im Densitometer-Diagramm nach Coomassie blue-Färbung bei den adhärenten Proteinen eine deut-

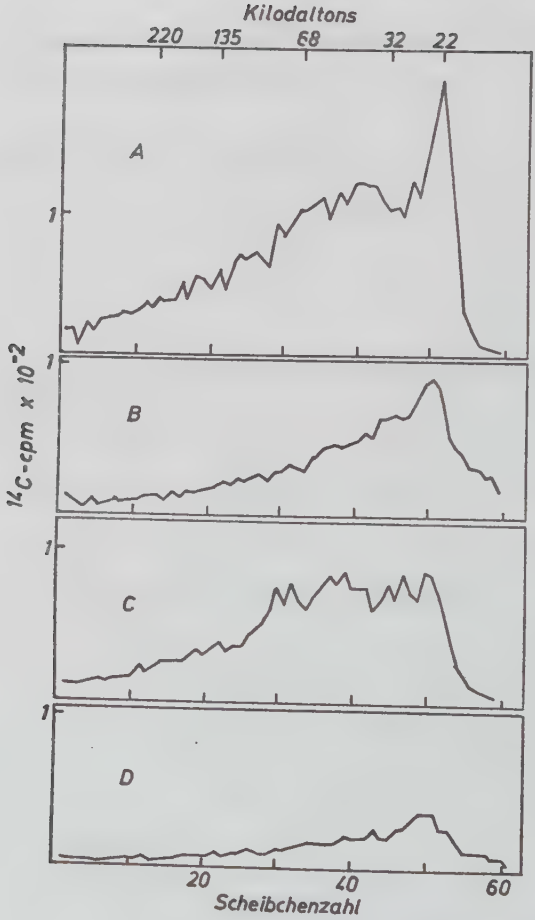

Abb.17,A-D. Verteilung der ^{14}C-Leucin-markierten Proteine in den Substrat-adhärenten Komponenten von STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Substrat: Glas. A: 1.Elution, B: 2.Elution, C: 3.Elution, D: 4.Elution.

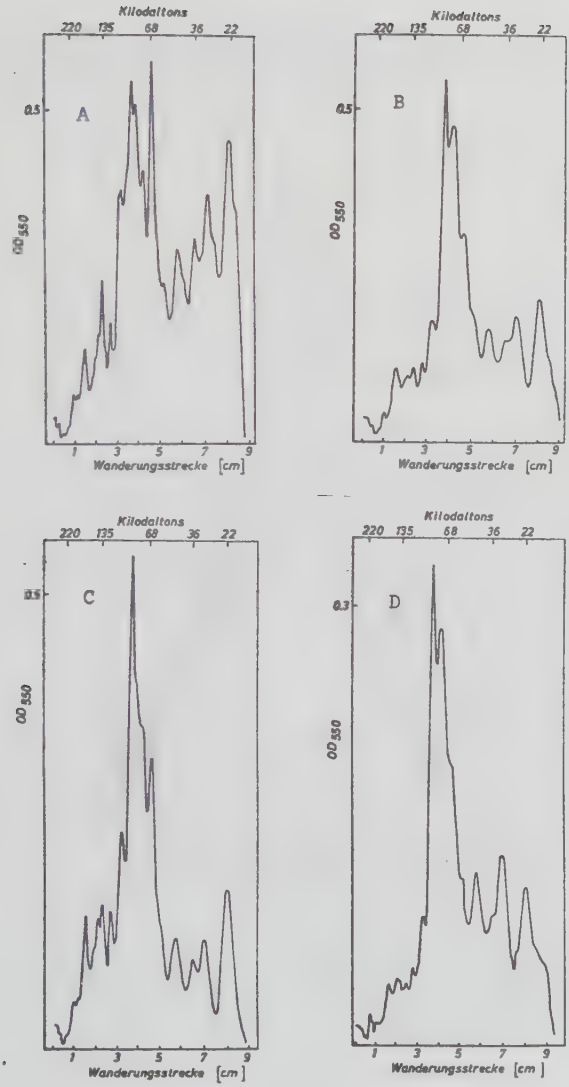

Abb.18,A-D. Legende siehe S.62 oben.

Abb.18,A-D. Densitometer-Diagramme (Coomassie brilliant blue-R 250-Färbung) nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Substrat-adhärenten Proteinen. Zellsystem: STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur. Substrat: Glas. A-D: 1.-4.Elution.

liche Erhöhung des Anteils kleinerer Proteine im Molekulargewichtsbereich bis ca. 30 Kd feststellen. Auch die Analyse der ^{14}C-Leucin-markierten Proteine zeigt dies deutlich.

Insgesamt ist bei den adhärenten, zellspezifischen Proteinen der STU51A/232B-Zellinie, wie bei den STU-D17-Zellen, ebenfalls eine starke Adhäsionsfähigkeit der Proteine im Bereich von 22 Kd Molekulargewicht festzustellen. Außerdem steigt die spezifische Radioaktivität der Proteine im Bereich von 18-25 Kd im Verlauf der Elution stark an (Abb.20, S.64).

Die Art und Zusammensetzung der adhärenten Proteine von STU-D17-Zellen und STU51A/232B-Zellen scheinen demnach keine merklichen Unterschiede aufzuweisen, weder im densitometrischen Diagramm noch in der ^{14}C-Leucin-Verteilung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine.

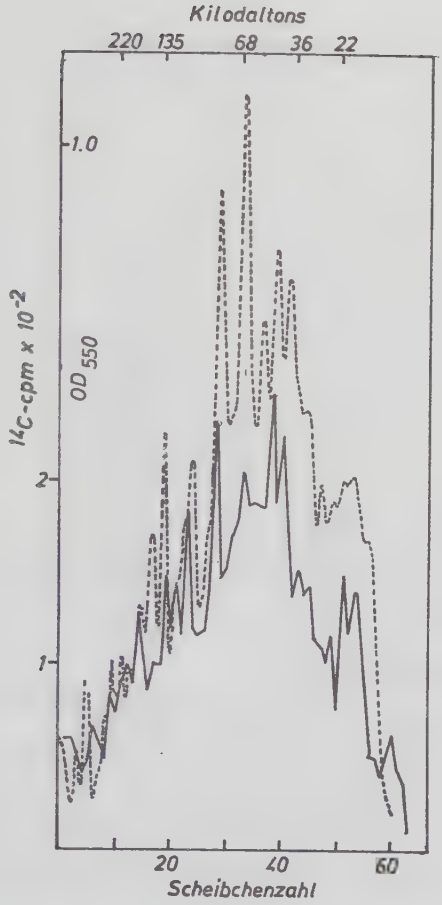

Abb.19. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Plasmamembran-Proteine von STU51A/232B-Zellen in Plattenkultur. ————: ^{14}C-Leucin-Markierung, -----: Densitometer-Diagramm (Coomassie brilliant blue R250-Färbung).

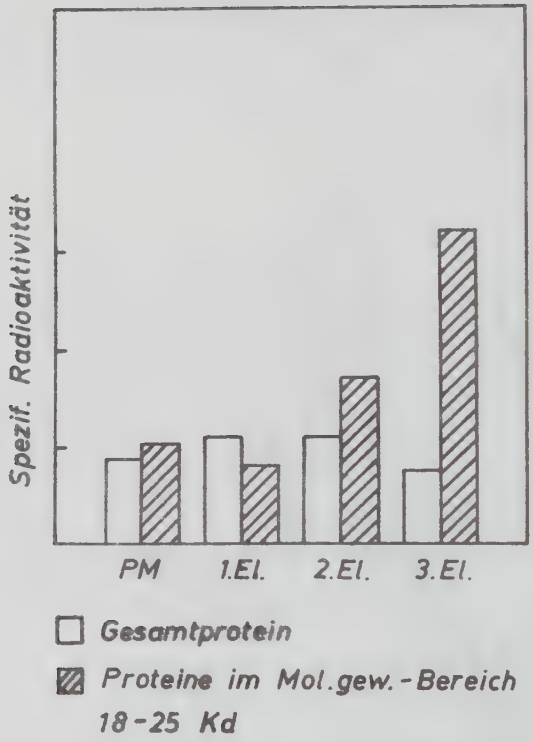

Abb.20. Spezifische Radioaktivität (^{14}C-Leucin-cpm/Proteinmasse) in Proteinen der Plasmamembran (PM) und den adhärenten Proteinen (1.-3.Eluat) von STU51A/232B-Zellen. Kulturgefäß: Roux-Schalen (Glas).

3.2.1.4. ^{3}H-Leucin-markierte Proteine am Glas-Substrat von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur

Es war festgestellt worden, daß im Kulturmedium von in Suspension wachsenden STU51A/232B-Zellen nur wenige Proteine vorhanden sind, welche von den Zellen aktiv synthetisiert worden waren (s.Kap. 2.6.2). Das Auftreten dieser Zellproteine im Kulturmedium ist aber möglicherweise eher durch den Verlust labiler äußerer Zellkomponenten beim Rühren der Zellen als durch eine aktive, spezifische Sezernierung durch die Zellen zu erklären.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur eventuell sezernierten Komponenten als Substrat-adhärente Moleküle zu finden sind und inwieweit man solche adhärenten Komponenten mit denjenigen von adhärent wachsenden Zellen vergleichen kann.

Dazu wurden STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur wie beschrieben (s.Kap.1.1) 60 Stunden bei 37^{o}C inkubiert. Die radioaktive Markierung der neusynthetisierten Zellproteine erfolgte mit 5 µCi/ml ^{3}H-Leucin bei je 500 ml Suspensionsvolumen/Flasche in 1l-Glasflaschen.

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Zellsuspension dekantiert und die Kulturgefäße zur vollständigen Entfernung eventuell anhaftender Zellen mit 0.5 mM EGTA, 2 mM PMSF in

PBS (je 20 ml/Flasche) 30 Minuten bei 37°C in einem Roller-Inkubator bei 2.5 rpm abgespült. Bis zu diesem Schritt einschließlich fand die Durchführung unter sterilen Bedingungen statt.

Zur Ablösung der am Glas haftenden Komponenten wurden die Kulturflaschen anschließend 60 Minuten bei 2.5 rpm, 37°C im Roller-Inkubator mit 1% SDS, 10 mM Tris-EDTA, 2 mM PMSF, 1% Mercaptoäthanol, pH 9.0 (je 20 ml/Flasche) eluiert. Dieser Vorgang wurde mit einer 2.Elution wiederholt. Daran schlossen sich zwei Elutionen (3 Minuten, 80°C) mit 1% SDS, 1% Mercaptoäthanol (je 20 ml/Flasche) an. Die Eluate wurden wie beschrieben aufgearbeitet (s.Kap. 2.3.1) und schließlich durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung zeigen Abb.21 (S.67) und Abb. 22 (S.68).

Als adhärent lassen sich wiederum praktisch die gleichen Proteine finden, wie sie auch bei den in Plattenkultur wachsenden Zellen auftreten (s.Kap. 3.2.1.1-3). Allerdings ist die Menge der adhärenten Proteine von Suspensionszellen so gering, daß nur im 1.Eluat nachweisbare Mengen vorhanden sind. Die Elutionsbedingungen bei diesem Versuch waren jedoch abgeändert im Vergleich zu Kap.3.2.1.1-3. Daher läßt sich über die spezifische Adhäsivität sowie über eine Änderung der spezifischen Radioaktivität bestimmter Proteine im Verlauf der Elution in diesem Falle nichts aussagen.

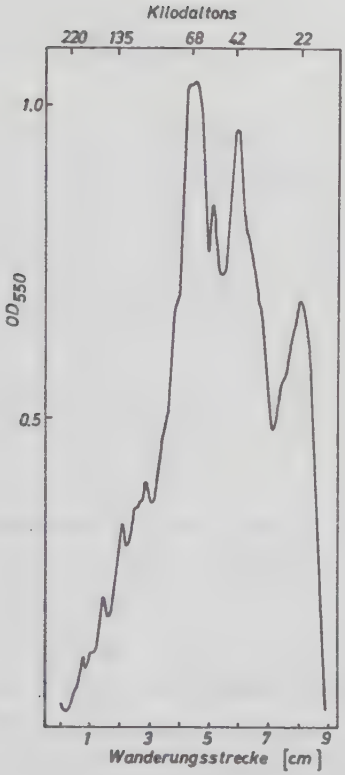

Abb.21. Densitometer-Diagramm der adhärenten Proteine von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Coomassie brilliant blue R 250-Färbung). Auftrag: 1.Eluat der adhärenten Proteine

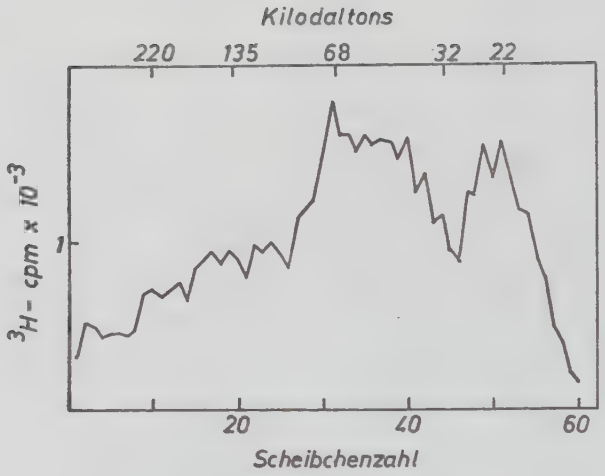

Abb.22. ^{3}H-Leucin-markierte Proteine im Substrat-adhärenten Material von STU51A/232B-Zellen in Suspensionskultur (Glas-Flaschen) nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Auftrag: 1.Eluat der adhärenten Proteine.

3.2.2. Markierung der adhärenten Zellkomponenten mit radioaktiver Fucose

Zelluläre Adhäsion an einem Substrat wird letzlich über Kräfte an der äußeren Begrenzung der Zellen geregelt. Die Plasmamembran als Teil der Zelloberfläche spielt dabei mit Sicherheit eine Rolle, ob nun lediglich als Verankerung eines die Adhäsion vermittelnden Zytoskeletts oder als direkt anhaftender Ausläufer der Zelloberfläche.

Die morphologischeAnalyse von Substrat-adhärentem Material nach Ablösung von Zellen mit EGTA-haltigem Puffer zeigte im Rasterelektronenmikroskop (82), daß es sich bei diesen adhärenten Strukturen um intakte Spitzen von Filopodien handelt, welche von den Zellen an den ehemaligen Adhäsionsstellen zurückgelassen worden waren. Es ist allerdings noch unklar, auf welcher Ebene zwischen Substrat und Zellkörper der Bruch der Adhäsion stattfindet, wenn unter den verwendeten Bedingungen die adhärenten Zellen von der Substratfläche losgelöst werden, um anschließend das zurückbleibende Substrat-adhärente Material zu untersuchen. Man kann jedoch erwarten, in diesem Material zumindest Teile der zellulären Plasmamembran zu finden. Möglicherweise weisen aber solche adhärenten Komponenten aufgrund ihrer spezifischen Funktion als Bestandteil der zellulären Adhäsionsstrukturen eine veränderte Zusammensetzung im Vergleich zu nicht-adhärenten Plasmamembranbereichen auf. Diese Möglichkeit sollte

auch anhand der Verteilung von ^{3}H-Fucose in den adhärenten Strukturen untersucht werden, da sich Fucose gut als spezifischer Marker für Plasmamembranen eignet (83-86). Die ^{3}H-Fucose-Verteilung in den Glykoproteinen der Plasmamembran von adhärent wachsenden STU-D17- und STU51A/232B-Zellen ist jeweils der ^{3}H-Fucose-Verteilung in den Fraktionen der adhärenten Glykoproteine gegenübergestellt.

Zur Untersuchung der ^{3}H-Fucose-Verteilung in adhärenten zellulären Komponenten wurden STU-D17-Zellen und STU51A/232B-Zellen während der logarithmischen Wachstumsphase mit 1 µCi pro ml ^{3}H-Fucose im Kulturmedium 60 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kulturgefäße wurden Roux-Schalen verwendet. Die Substrat-adhärenten Komponenten wurden nach Ablösen der Zellen wie beschrieben vom Substrat sequentiell eluiert (s.Kap.2.3.1) und schließlich mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

3.2.2.1. ^{3}H-Fucose-markierte adhärente Komponenten von STU-D17-Zellen

Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung derSubstrat-adhärenten Komponenten von STU-D17-Zellen zeigt Abb.23, S.71. ^{3}H-Fucose-haltige adhärente Komponenten lassen sich demnach bei den STU-D17-Zellen bereits mit der ersten Elution vom Substrat ablösen; die 2. und 3.Elution liefert jeweils nur noch geringfügige Mengen Fucose-markierter Kompo-

nenten ohne ausgeprägte Einzelfraktionen. Eine 4.Elution enthielt keine ^{3}H-Fucose-markierten Komponenten mehr.

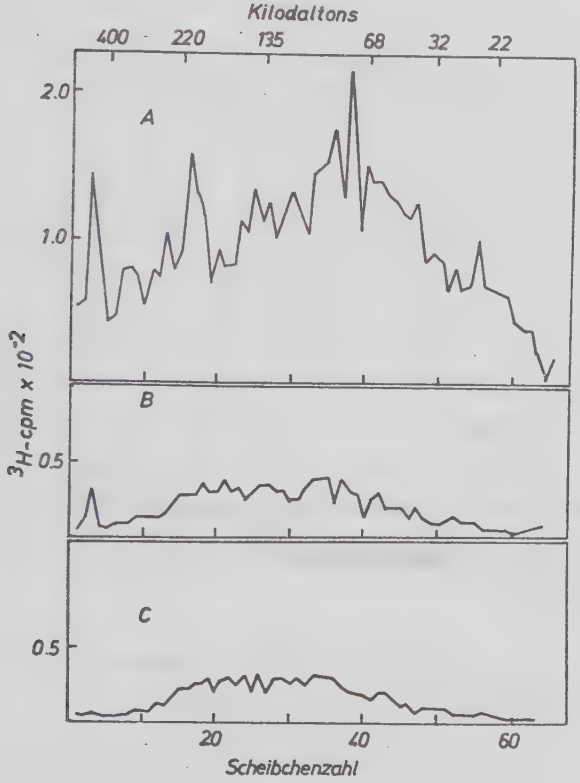

Abb.23,A-C. ^{3}H-Fucose-markierte Komponenten im Substrat-adhärenten Material von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Kulturgefäß: Roux-Schalen. A: 1.Elution, B: 2.Elution, C: 3.Elution.

Die scheinbaren Molekulargewichte der eluierten Komponenten liegen für den größeren Teil zwischen 35 und 300 Kd, wobei prägnante Einzelfraktionen bei 75, 80, 110, 135 und vor allem bei 220 Kd vorhanden sind. Daneben fällt auch noch die deutliche Markierung einer Komponente von mehr als 400 Kd Molekulargewicht auf, die kaum in das Gel eingewandert ist. Diese Bande ist auch im 2.Eluat noch vorhanden.

Im Molekulargewichtsbereich kleiner 30 Kd ist nur eine schwache ^{3}H-Fucose-Markierung zu finden. Lediglich bei ca. 25 Kd tritt eine deutlicher markierte Bande auf.

Im Vergleich zur ^{3}H-Fucose-Verteilung in den Glykoproteinen der Plasmamembran (Abb.24, S.73) ergeben sich keine ausgeprägten qualitativen Unterschiede mit dem 1.Eluat der adhärenten Glykoproteine (Abb.23,A). Quantitativ gesehen sind allerdings die Maxima der ^{3}H-Fucose-markierten Banden in der Plasmamembran viel stärker ausgeprägt als bei den adhärenten Komponenten.

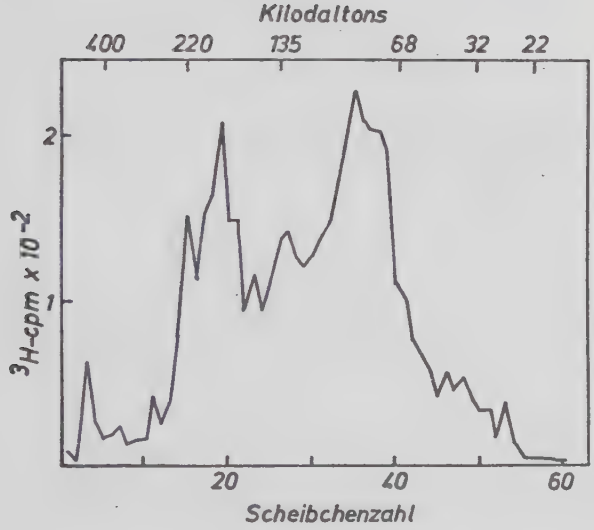

Abb.24. ^{3}H-Fucose-Verteilung in den Glykoproteinen der Plasmamembranen von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

3.2.2.2. ^{3}H-Fucose-markierte adhärente Komponenten von STU51A/232B-Zellen

Für die Verteilung von ^{3}H-Fucose-markierten Komponenten ergibt sich für diese Zellinie weitgehend das gleiche Bild wie für die STU-D17-Zellen, jedoch mit weniger signifikanten Maxima bei 70-90 Kd und 180-230 Kd im 1.Eluat (Abb.25, S.75). Die quantitative Verteilung in den einzelnen Elutionsstufen der adhärenten Komponenten ist ebenfalls sehr ähnlich zu den Verhältnissen bei STU-D17-Zellen.

Allerdings gilt diese Übereinstimmung nicht für die Komponente mit über 400 Kd Molekulargewicht. Bei den adhärent wachsenden STU51A/232B-Zellen fehlt diese Bande im ^{3}H-Fucose-Muster der eluierten adhärenten Komponenten vollständig. Außerdem ist im 1.Eluat der STU51A/232B-Zellen der ^{3}H-Fucose-Einbau in Glykoproteine des Molekulargewichtsbereichs von ca. 150-200 relativ stärker als bei den STU-D17-Zellen.

Vergleicht man die Elutionsmuster der ^{3}H-Fucose-markierten adhärenten Komponenten dieser Zellinie mit der entsprechenden Markierung in der Plasmamembran (Abb. 26, S.76), so zeigt die 1.Elution der adhärenten Komponenten nur geringe Unterschiede zur entsprechenden ^{3}H-Fucose-Verteilung in der Plasmamembran. Insbesondere zeigt die Plasmamembran stärker ausgeprägte Maxima bei ca. 90,150 und 220 Kd, während die Minima in der Verteilung des ^{3}H-Fucose-Einbaus vergleichbar sind.

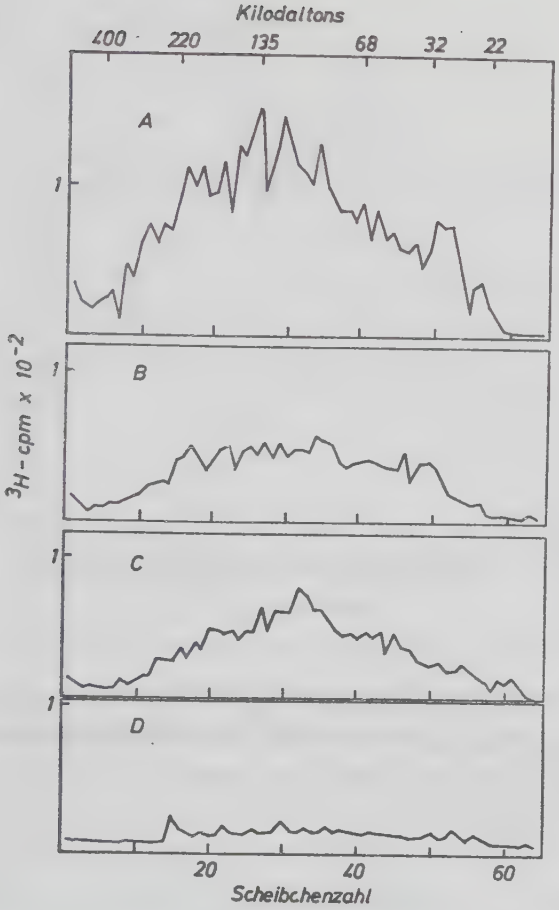

Abb.25,A-D. ^{3}H-Fucose-markierte Komponenten im Substrat-adhärenten Material von STU51A/232B-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Kulturgefäß: Roux-Schalen. A: 1.Elution, B: 2.Elution, C: 3.Elution, D: 4.Elution.

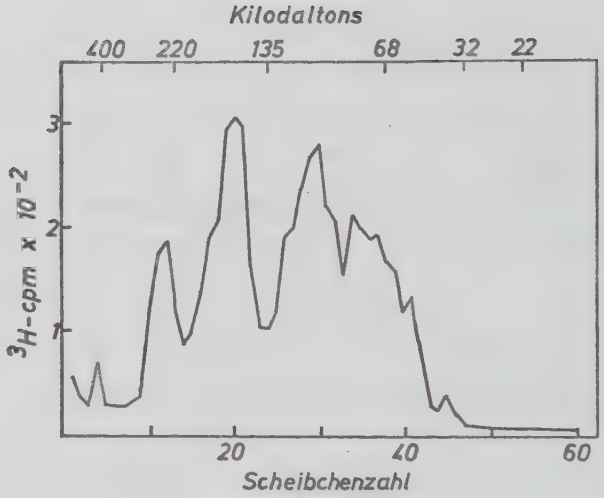

Abb.26. ^{3}H-Fucose-Verteilung in den Glykoproteinen der Plasmamembranen von STU51A/232B-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Bei beiden untersuchten Zellinien ließ sich also ein Fucose-Einbau in Substrat-adhärentes Material feststellen. Die entsprechend markierten Komponenten sind jedoch weitgehend im ersten Elutionsschritt abgelöst worden, sodaß man ihnen keine besondere spezifische Adhäsionskapazität zusprechen kann. Sehr wahrscheinlich sind sie mit den eigentlichen adhärenten Bereichen der Zellen nur assoziiert. Die durch Leucin-Einbau charakterisierten, stark adhärenten Proteine weisen jedenfalls keine signifikante Fucose-Markierung auf.

3.2.3. Markierung der adhärenten Zellkomponenten mit radioaktivem Glukosamin und Sulfat

Vertebraten-Zellen besitzen meist einen Zellmantel (Glycocalyx), der hauptsächlich aus Glykosphingolipiden, sauren Mucopolysacchariden und Glykoproteinen besteht. Aufgrund der Lokalisation dieser zellulären Komponenten ist es nicht verwunderlich, daß als "Mikroexudat" oder Substrat-adhärentes Material neben einer Reihe von Proteinen und RNS vor allem auch Glykoproteine, Proteoglykane und Glykosaminoglykane gefunden worden sind (41, 42, 47, 87). Nach Culp (47) bilden bei den adhärenten Glykosaminoglykanen Hyaluronsäure und bei den sulfathaltigen Glykosaminoglykanen Heparansulfat und Chondroitinsulfat die Hauptmenge der Glukosamin-markierten Komponenten bei Balb/c3T3-Zellen.

Glukosamin wird, neben Fucose, ebenfalls gut in die Plasmamembran von Zellen eingebaut, auch wenn es einem höheren metabolischen Umsatz als Fucose unterliegt (88).

Im Folgenden wurden daher adhärent wachsende STU-D17- und STU51A/232B-Zellen mit radioaktivem Glukosamin und Sulfat inkubiert, um die Verteilung von Glykosaminoglykanen, sauren Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen im Substrat-adhärenten Material zu untersuchen. Daneben sollte der Vergleich mit entsprechend markierten Komponenten der Plasmamembranen eventuell Aufschlüsse über die spezifische Rolle der Glyko-Anteile bei der zellulären Adhäsion am Substrat bringen.

Die Identität des in Substrat-adhärentem Material und in Plasmamembran eingebauten radioaktiven Glukosamins wurde mittels Aminosäure/Hexosamin-Analyse von sauren Hydrolysaten der entsprechenden Proben und anschließender Szintillationszählung kontrolliert (s.Kap.Mat. u. Meth.). Es ließ sich feststellen, daß die eingebaute Radioaktivität in den Proben sich ausschließlich in der Glukosamin-Fraktion befand.

3.2.3.1. ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierte adhärente Komponenten von STU-D17-Zellen

Frisch ausgesäte STU-D17-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden wie beschrieben (s.Kap.2.3.1) 60 Stunden bei 37°C in Roux-Schalen inkubiert. Das Kulturmedium enthielt dabei insgesamt 1 µCi/ml ^{3}H-Glukosamin und 10 µCi pro ml $Na_2{}^{35}SO_4$. Nach Ablösen der Zellen wurden die Plasmamembranen isoliert (s.Kap. Mat. u. Meth.), während die adhärenten Komponenten wie beschrieben vom Substrat abgelöst wurden (s.Kap. 2.3.1).

Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung von Komponenten der Plasmamembran und der eluierten adhärenten Strukturen zeigen Abb.27, S.80 (Plasmamembran) und Abb.28, S.81 (Adhärente Strukturen).

Bei den adhärenten Komponenten findet man zumindest im 1.Eluat, teilweise auch noch im 2.Eluat, ^{35}S-markierte Komponenten (Abb.28, A u.B). Neben einer deutlich markierten Bande am Gelanfang (größer als 400 Kd) treten mehrere ^{35}S-haltige Banden in einem Molekulargewichtsbereich zwischen ca. 60 bis 300 Kd auf. Die spezifische Radioaktivität der ^{35}S-haltigen Komponenten nimmt in der Reihenfolge der Elution aber sehr schnell ab, so daß im 3. und 4.Eluat keine ^{35}S-haltigen Komponenten mehr nachzuweisen sind.

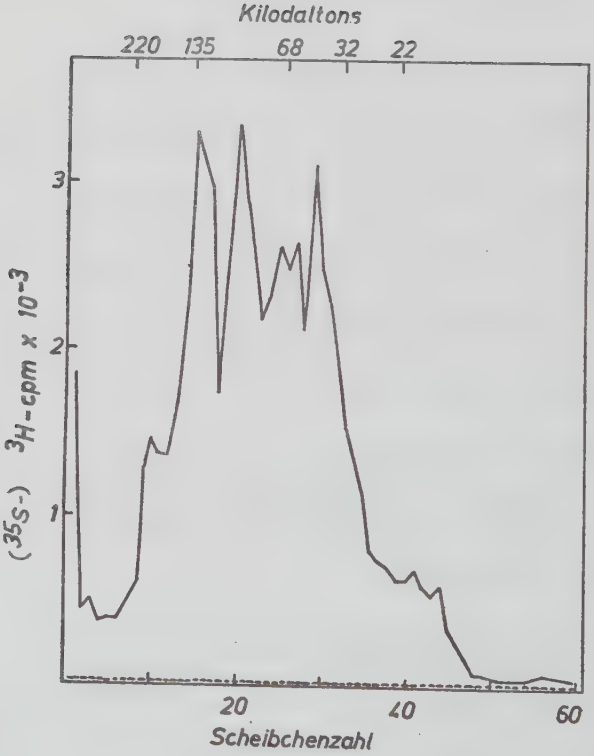

Abb.27. Verteilung der ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierten Komponenten in den Plasmamembranen von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. ———: ^{3}H-Glukosamin, (-----: ^{35}S.).

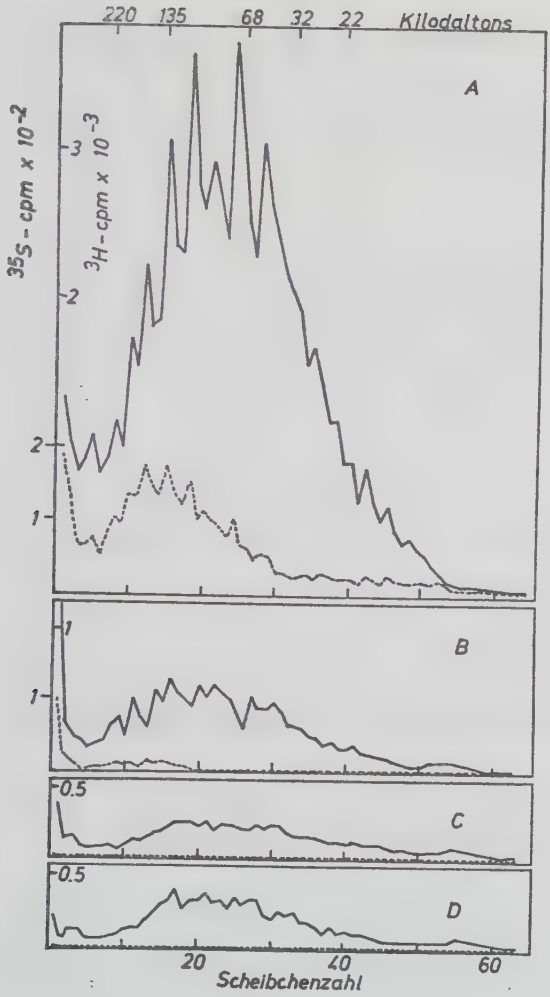

Abb. 28, A-D. Legende siehe Seite 82.

Abb.28,A-D. Verteilung der ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierten Komponenten im Substrat-adhärenten Material von STU-D17-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Kultursubstrat: Roux-Schalen. A-D: 1.-4.Elution. ——: ^{3}H, ---: ^{35}S.

In der Plasmamembran-Fraktion von STU-D17-Zellen sind keine ^{35}S-markierten Komponenten nachweisbar. Möglicherweise sind aber ^{35}S-haltige Strukturen aus der Zell-Glycocalyx bei der Isolierung und Reinigung der Plasmamembran-Fraktion verlorengegangen.

Was die ^{3}H-Glukosamin-Markierung betrifft, so findet man in der Plasmamembran der STU-D17-Zellen im Molekulargewichtsbereich zwischen ca. 40 - 200 Kd eine Reihe von ^{3}H-Glukosamin-haltigen Banden, deren ausgeprägte Einzelfraktionen scheinbare Molekulargewichte von 50, 65, 70, 85, 135 und 195 Kd aufweisen. Daneben existiert eine starke ^{3}H-Glukosamin-haltige Bande bei einem Molekulargewicht größer 400 Kd, die nicht in das Gel eingedrungen ist.

Auch in den adhärenten Strukturen befindet sich zwischen 40-300 Kd der Großteil der ^{3}H-Glukosamin-Markierung. Auch eine markierte Bande bei einem Molekulargewicht größer 400 Kd ist vorhanden, die im 2.Eluat(Abb.28 B) besonders ausgeprägt ist. Unter einem Molekulargewicht von 30 Kd liegen praktisch keine ^{3}H-Glukosamin-markierten Banden mehr vor. Im Vergleich zur Plasmamembran treten im 1.Eluat der adhärenten Kompo-

nenten einige zusätzliche oder stärker markierte Banden auf bei 70, 110, 170, 220 und 290 Kd. Die Bande mit einem Molekulargewicht größer 400 Kd ist dagegen deutlich schwächer ausgeprägt als bei der Plasmamembran.

Die spezifische Radioaktivität bezüglich des ^{3}H-Glukosamin-Gehalts nimmt in den Eluaten der adhärenten Komponenten mit fortschreitender Elution stark ab. Im 1.Eluat ist die spezifische ^{3}H-Radioaktivität der adhärenten Komponenten allerdings noch derjenigen der Plasmamembran vergleichbar.

Die im adhärenten Material gefundenen, im Vergleich zur Plasmamembran neu aufgetauchten ^{3}H-Glukosamin-haltigen Banden stellen möglicherweise adhäsionsspezifische Komponenten dar. Eventuell ist aber lediglich die Trennkapazität in dem Elektrophorese-Gel mit adhärentem Material besser als in demjenigen mit Plasmamembran-Auftrag.

3.2.3.2. ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierte adhärente Komponenten von STU51A/232B-Zellen

Die Inkubation der STU51A/232B-Zellen in Roux-Schalen erfolgte wie beschrieben (Kap.1.2), die radioaktive Markierung mit ^{3}H-Glukosamin und $Na_2{}^{35}SO_4$ wurde in gleicher Weise wie bei den STU-D17-Zellen durchgeführt (s.Kap. 3.2.3.1). Die Auftrennung der wie üblich eluierten (s.Kap.2.3.1) adhären-

ten Komponenten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt Abb.29.

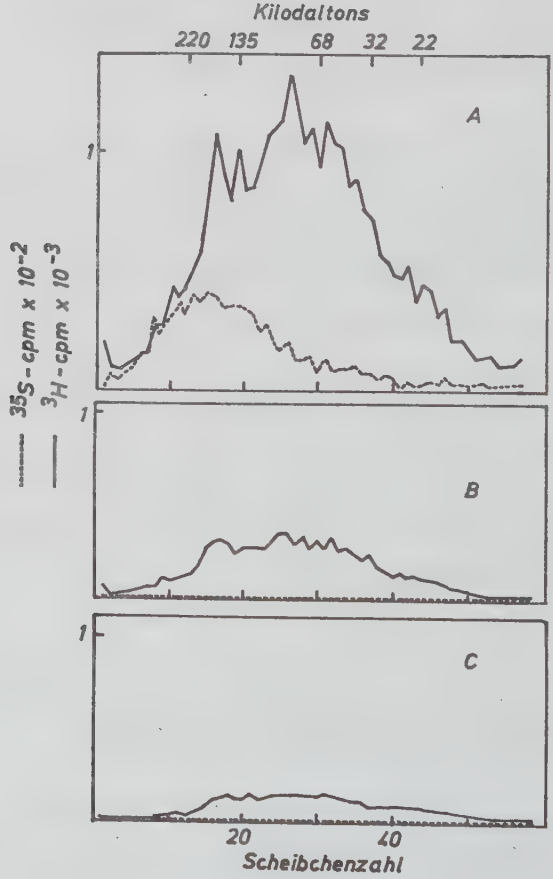

Abb.29. Legende siehe Seite 85.

Abb.29,A-C. Verteilung der ^{3}H-Glukosamin- und $Na_2{}^{35}SO_4$-markierten Komponenten im Substrat-adhärenten Material von STU51A/232B-Zellen nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Kultursubstrat: Roux-Schalen. A-C: 1.-3.Elution.

Auch bei den adhärent gewachsenen STU51A/232B-Zellen findet man nur im 1.Eluat der adhärenten Komponenten einen nachweisbaren ^{35}S-Einbau, wobei die ^{35}S-markierten Banden im Molekulargewichtsbereich von ca. 60-350 Kd liegen. In den späteren Eluaten sind keine ^{35}S- markierten Komponenten mehr festzustellen.

Daß es sich bei der eingebauten ^{35}S-Markierung in den adhärenten Komponenten wahrscheinlich um sulfatierte Glykosaminoglykane handelt, läßt die Aminosäure/Hexosamin-Analyse von sauren Hydrolysaten der entsprechenden Proben vermuten. In keiner der in Frage kommenden Aminosäure-Fraktionen (Methionin, Methioninoxid, Methioninsulfon, Cystein und Cystin bzw. Cysteinsäure) konnte ^{35}S-Radioaktivität nachgewiesen werden.

Was die ^{3}H-Glukosamin-markierten Komponenten betrifft, so zeigen auch die STU51A/232B-Zellen eine breite Verteilung solcher Komponenten im Molekulargewichtsbereich von ca. 30-350 Kd, während die Bande größer 400 Kd hier praktisch nicht vorhanden ist. Auch die spezifische Radioaktivität ist, vor allem im 1.Eluat der adhärenten Strukturen, deut-

lich geringer als bei der entsprechenden Probe von STU-D17-Zellen. Außerdem ist der Einbau von ^{3}H-Glukosamin in den einzelnen adhärenten Fraktionen des 1.Eluats, vor allem bei 70, 110 und 135 Kd, deutlich weniger ausgeprägt als bei den STU-D17-Zellen.

Bei beiden untersuchten Zellinien konnte also in den abgelösten Substrat-adhärenten Strukturen eine Reihe von Komponenten mit Glukosamin-Anteilen (Glykoproteine oder Proteoglykane) gefunden werden, die aber in ihrer spezifischen Radioaktivität und im quantitativen Anteil der einzelnen Fraktionen Unterschiede zwischen den beiden Zellinien erkennen lassen.

Der Anteil an sauren Glykoproteinen und sulfatierten Glykosaminoglykanen ist bei beiden Zellinien gering, doch zeigen die adhärenten Komponenten im Gegensatz zur Plasmamembran einen deutlichen Einbau von ^{35}S.

Die im adhärenten Material gefundenen sulfatierten Glykosaminoglykane und Glykoproteine dürften aufgrund ihrer leichten Eluierbarkeit kaum als ausgesprochen spezifische Komponenten der Zelladhärenz in Betracht kommen, im Gegensatz zu den 18-25 Kd-Proteinen (s.Kap.3.2.1), die nach den vorliegenden Ergebnissen weder Glukosamin noch Schwefel enthalten.

3.2.4. Endogene Phosphorylierung der adhärenten Komponenten von STU51A/232B-Zellen mit γ-(^{32}P)-ATP

Die kontraktilen Eigenschaften von Zellen spielen bei dem dynamischen Prozeß der Adhäsion und der Fortbewegung eine wichtige Rolle. Darauf weist auch die enge Verknüpfung von Actomyosin-Komplexen mit der Zelloberfläche adhärent wachsender und sich fortbewegender Zellen hin (64, 89-92).

In diesem Zusammenhang verdienen die Untersuchungen Beachtung, nach denen die extrazelluläre Zugabe von ATP Einfluß nimmt auf die Kontraktionsvorgänge an der Zelloberfläche und auf die Adhäsion und Fortbewegung von Zellen (56, 93-95). Auch über eine Rolle von zellulären Ecto-ATPasen bei der Adhäsion und Fortbewegung der Zellen wird diskutiert (96-98).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien, wie sie in (99, 100) zusammenfassend behandelt wurden, weisen außerdem darauf hin, daß Protein-Phosphorylierung ein weit verbreiteter Mechanismus bei verschiedenen regulatorischen Reaktionen darstellt.

Im folgenden Versuch sollte daher untersucht werden, ob sich im Substrat-adhärenten Material von STU51A/232B-Zellen nach Zugabe von exogenem ATP Kinase-Aktivität und damit phosphorylierte Komponenten nachweisen ließen, die möglicherweise für regulatorische Funktionen bei der Zelladhäsion

verantwortlich sind. Die STU51A/232B-Zellinie wurde deshalb gewählt, da von diesen Zellen das Muster der ATP-phosphorylierbaren Proteine in der Plasmamembran schon gut untersucht war (101).

Vor der Phosphorylierung der Substrat-adhärenten Komponenten wurden STU51A/232B-Zellen wie beschrieben angezüchtet (s.Kap.1.2) und gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase von den Kulturgefäßen (Roux-Schalen) quantitativ abgelöst (s.Kap.2.2.1). Die Phosphorylierung der adhärenten Komponenten mit insgesamt 2 mCi γ-(^{32}P)-ATP erfolgte wie im Kapitel V (Mat. u. Meth.) beschrieben. Nach der Elution der adhärenten Komponenten im Anschluß an die Phosphorylierung wurden die Eluate schließlich mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Abb.30 (S.89) zeigt die Verteilung des eingebauten ^{32}P-Phosphats in den Phosphoproteinen der adhärenten Strukturen. Danach findet man im ersten Eluat vor allem die Markierung einer Bande von 100$\pm$ 10 Kd Molekulargewicht, daneben im ersten Gelscheibchen eine deutliche Markierung. Bei ca. 65-75 und 170-200 Kd treten weitere prägnante phosphorylierte Proteine auf über einem undifferenzierten Hintergrund markierter Proteine zwischen 20 und 300 Kd.

Im 2.Eluat nimmt die spezifische Radioaktivität der Phospho-

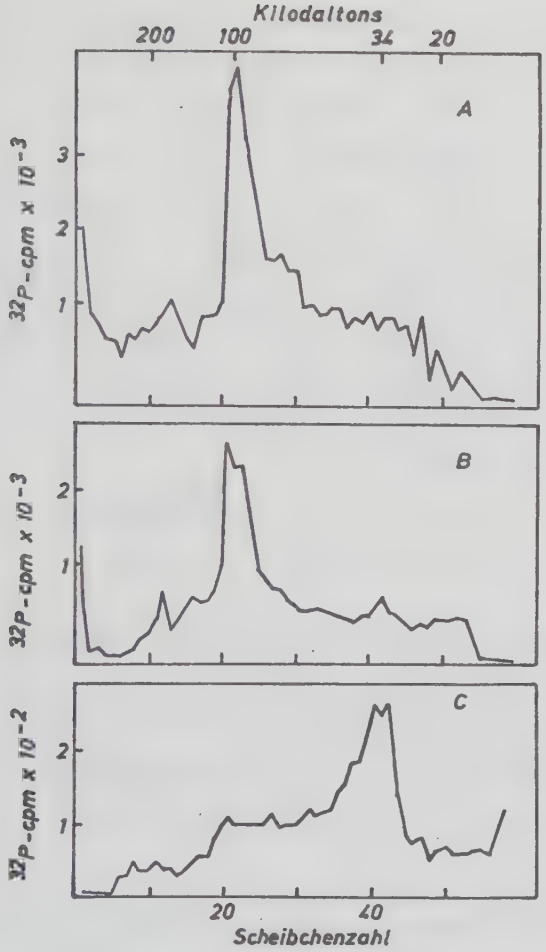

Abb.30,A-C. Verteilung der Phosphoproteine im Substrat-adhärenten Material von STU51A/232B-Zellen nach Inkubation der adhärenten Strukturen mit γ-(^{32}P)-ATP (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). A-C: 1.-3.Elution.

proteine ab, doch tritt praktisch das gleiche Muster an Phosphoproteinen auf wie im 1.Eluat. Lediglich eine Bande um 34 Kd hebt sich im Vergleich zum 1.Eluat durch eine relativ stärkere Markierung ab.

Im 3.Eluat (Abb.30 C) findet man, ganz im Gegensatz zu den vorhergehenden Eluaten, ganz dominant die Bande bei 34 Kd (mit einer breiten Schulter bis ca. 45 Kd) markiert, während die 100 Kd-Bande praktisch nicht markiert ist. Allerdings ist die spezifische Radioaktivität der Phosphoproteine im 3.Eluat nur noch sehr gering im Vergleich zu den beiden ersten Eluaten.

Insgesamt dominiert bei den Phosphoproteinen der adhärenten Komponenten also rein quantitativ eine Bande mit 100± 10 Kd Molekulargewicht, neben einer Reihe weniger deutlich markierter Proteine. Bei der Betrachtung der verschiedenen Adhäsionskapazität der Phosphoproteine zeigt sich aber, daß eine niedermolekulare Bande mit ca. 34 Kd Molekulargewicht mit fortschreitender Elution anteilsmäßig zunimmt, also offensichtlich durch eine hohe Adhäsionskapazität gekennzeichnet ist.

Die relative ^{32}P-Radioaktivität der Phosphoproteine in den Bereichen von 34-45 Kd und 90-110 Kd Molekulargewicht ist in Abb.31 (S.91) für die einzelnen Elutionsstufen dargestellt, wobei jeweils die Gesamtradioaktivität im Elektrophorese-

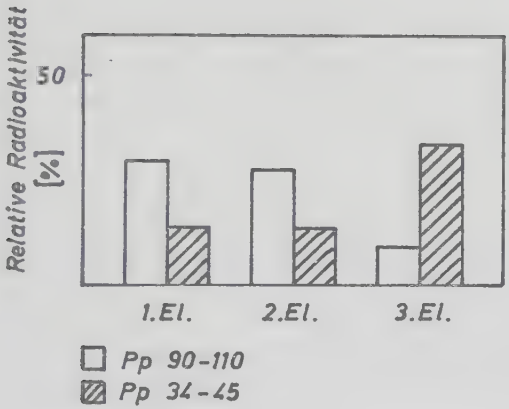

Abb.31. Relative ^{32}P-Radioaktivität der Phosphoproteine in den Substrat-adhärenten Komponenten von STU51A/232B-Zellen (Gesamtradioaktivität im Gel =100%). 1.-3.Eluat.

Gel gleich 100% gesetzt wurde. Es zeigt sich, daß die relative Radioaktivität der 34-45 Kd-Phosphoproteine im 3.Eluat wesentlich höher ist als in den beiden ersten Eluaten. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß - wie bei den Leucin-markierten 18-25 Kd-Proteinen - die relativen Radioaktivitäten der 34-45 Kd-Phosphoproteine auch erst im 3.Eluat

signifikant höher werden. Offensichtlich werden also bei der 3.Elution besonders spezifische Adhäsionskomponenten eluiert.

III. Zusammenfassung

Die adhärenten Strukturen zweier virus-transformierter Zellinien (STU51A/232B, STU-D17) wurden untersucht unter verschiedenen Substrat-Bedingungen (Glas- und Plastik-Kulturgefäße) bei Wachstum in Platten- und in Suspensionskultur.

Durch Vormarkierung der Zellen bzw. durch endogene Phosphorylierung der adhärenten Zellstrukturen konnte mit einer stufenweisen Elution ein Maß für die Adhäsionskapazität zellulärer Komponenten festgelegt werden. Als Parameter wurde dabei die spezifische Radioaktivität oder die relative radioaktive Markierung bestimmter Zellkomponenten verwendet.

Bei der Vormarkierung mit radioaktivem Leucin erwies sich eine Proteingruppe von 18-25 Kd Molekulargewicht als besonders adhäsiv unter den adhärenten Proteinen.

Bei der endogenen Phosphorylierung mit γ-(^{32}P)-ATP fiel eine Gruppe von Phosphoproteinen mit 34-45 Kd Molekulargewicht durch ihre hohe Adhäsionskapazität auf. Die Identität dieser stark adhärenten Proteine und Phosphoproteine wurde diskutiert.

Neben den beiden stark adhäsiven Proteingruppen fanden sich bei den adhärenten Strukturen beider Zellinien in einem breiten Molekulargewichtsbereich eine Reihe weiterer Proteine, Glykoproteine und sulfatierter Glykoproteine, denen aber

nach den Kriterien der stufenweisen Elution keine besonders hohe Adhäsionskapazität zugesprochen werden kann.

Zwischen den beiden untersuchten Zellinien traten Unterschiede auf in den Kohlenhydrat- und Schwefel-haltigen Komponenten der adhärenten Strukturen, vor allem im Molekulargewichtsbereich über 400 Kd.
Dagegen konnte kein Einfluß der chemischen Natur des verwendeten Kultursubstrats auf die Art und Zusammensetzung zellulärer Adhäsionsstrukturen gefunden werden.
Es wurde ferner festgestellt, daß auch bei Suspensionskulturen von STU51A/232B-Zellen Substrat-adhärente Komponenten gefunden werden, wie sie diese Zellen bei adhärentem Wachstum bilden.

IV. Diskussion

Untersuchungen der Adhäsion und der Ausbreitung von Zellen auf einem künstlichen festen Substrat bieten eine Basis, Erkenntnisse über die adhäsiven Eigenschaften der Zellen und der beteiligten zellulären Strukturen zu gewinnen, die auch eine potentielle Rolle bei der natürlichen Wechselwirkung zwischen Zellen und biologischen Oberflächen bzw. bei der Zell-Zell-Adhäsion spielen können. Diese Adhäsionsphänomene sind vor allem auch deshalb Gegenstand des Interesses, da zwischen normalen Zellen und chemisch oder virustransformierten Zellen auffallende Unterschiede im sozialen Verhalten bestehen.

Die Analyse der Zell-Substrat-Adhäsion macht sich den Vorteil zunutze, daß im Gegensatz zur Zell-Zell-Adhäsion das künstliche Substrat eine statische Größe darstellt. Durch ein Ablösen adhärent gewachsener Zellen mit milden, nichtdegradierenden Reagentien erreicht man, daß am Substrat Teile der Zelloberflächen-Strukturen zurückbleiben, welche am Adhäsionsprozeß beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wird die Zell-Substrat-Adhäsion von zwei verschiedenen virus-transformierten Zellinien in der logarithmischen Wachstumsphase untersucht. Die Kriterien einer möglichst schonenden und gleichzeitig quantitativen Ablösung der Zellen vom Substrat müssen so gewählt sein,

daß die aktiv adhäsiven Zellkomponenten möglichst quantitativ auf dem Substrat zurückbleiben. Dabei läßt sich nicht ausschließen, daß einerseits Zellkomponenten, die mit den aktiv adhärenten Komponenten nur assoziiert sind, ebenfalls zurückbleiben, andererseits aber auch Komponenten aus dem Kulturmedium unspezifisch am Substrat adsorbiert bleiben. Durch stufenweise Elution des Substrat-adhärenten Materials sollte jedoch graduell die Adhäsionskapazität von aktiv adhärenten und unspezifisch adhärenten Komponenten charakterisiert werden können. Die gewählten Ablösungskriterien lassen die Zellen intakt, sodaß eine sekundäre Adsorption von lysiertem Zellmaterial am Substrat ausgeschlossen werden kann.

Ein wesentliches Problem ergab sich in der Frage nach einem qualitativen oder quantitativen Maß für die Adhäsionskapazität der verschiedenen aktiv adhärenten Komponenten der Zellen. Die Adhäsionsfähigkeit läßt sich quantitativ beschreiben, indem bei der stufenweisen Elution der adhärenten Komponenten die Änderung der spezifischen oder relativen Radioaktivität der vormarkierten zellulären Strukturen ermittelt wird.

Als radioaktive Vorstufen wurden den Zellen ^{3}H- bzw. ^{14}C-Leucin, ^{3}H-Fucose, ^{3}H-Glukosamin und $Na_2{}^{35}SO_4$ während einer Wachstumsphase von 60 Stunden zum Einbau angeboten. Ferner wurde nach Ablösung der Zellen versucht, durch Inkubation

der adhärenten Strukturen mit γ-(^{32}P)-ATP eine Protein-Phosphorylierung durch endogene Kinasen nachzuweisen. Das Vorkommen endogener Kinasen in der Plasmamembran dieser Zellen ist aus anderen Versuchen bekannt (102-104).

Bei den radioaktiv markierten zellulären Komponenten fallen nach der vorliegenden Untersuchung vor allem zwei Proteingruppen durch ihre besonders hohe Adhäsionskapazität auf: Bei der Vormarkierung der Zellen mit ^{14}C-Leucin wird die Proteingruppe im Molekulargewichtsbereich von 18-25 Kd wesentlich schlechter eluiert als Proteinfraktionen in den anderen Molekulargewichtsbereichen. Dies drückt sich darin aus, daß in dem Molekulargewichtsbereich von 18-25 Kd die spezifische Radioaktivität der Proteine bis zur 3.Elutionsstufe um den Faktor 4 ansteigt.

Darüberhinaus konnte bei der endogenen Phosphorylierung der am Substrat verbliebenen, adhärenten Zellstrukturen eine weitere Fraktion von Phosphoproteinen mit sehr hoher Adhäsionskapazität im Molekulargewichtsbereich von 34-45 Kd aufgrund der relativen Zunahme der Radioaktivität nachgewiesen werden. Die Proteinmasse der 34-45 Kd-Phosphoproteine ist aber sehr gering, sodaß die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität nicht möglich war. Dies ist auch der Grund, weshalb diese Proteingruppe bei der Vormarkierung der Zellen mit ^{14}C-Leucin sich nicht eindeutig von den übrigen Proteinen abhob. Die 18-25 Kd-Proteingruppe dagegen, die

bei der ^{14}C-Leucin-Markierung auftritt, stellt rein quantitativ einen erheblichen Anteil der aktiv adhärenten Zellproteine dar. Jedenfalls handelt es sich bei beiden Proteingruppen um zelluläre Komponenten, da eine entsprechende Kontroll-Inkubation der radioaktiven Vorstufen mit Kulturmedium keine radioaktivmarkierten, nochmolekularen Serumkomponenten Substrat-adhärent zurückläßt.

Der Nachweis phosphorylierbarer Proteine in adhärenten zellulären Strukturen durch endogene Phosphorylierung bedeutet aber auch, daß diese 34-45 Kd-Komponenten durch endogene Kinasen phosphoryliert werden, die ebenfalls in zellulären Adhäsionsstrukturen enthalten sind. Möglicherweise stellen die beiden stark adhäsiven Proteingruppen (18-25, 34-45 Kd) Teile zellulärer Actomyosin-Komplexe dar, die ja in Form von Microfilamenten eine wichtige dynamisch-strukturelle Rolle bei der zellulären Adhäsion spielen und auch Kinase-Aktivität enthalten (89, 92, 105-108). Rees et.al. (64) haben u.a. Actin, Myosin, α-Actinin und Tropomyosin durch Immunfluoreszenz als Bestandteile focaler Adhäsionen bei Ratten-Fibroblastenzellen nachgewiesen. Für die nach der hier verwendeten Methode der stufenweisen Elution gefundenen, stark adhäsiven Zellkomponenten kommen demnach Tropomyosin (33, 37 Kd), Myosin (18, 21 Kd-Untereinheiten) sowie eventuell Actin (46 Kd) in Betracht. Culp (109) findet demgegenüber nach Vormarkierung der Zellen in dem Molekulargewichtsbereich von 18-25 Kd keine Leucin-markierten Pro-

teine im Substrat-adhärenten Material von Balb/c3T3 oder SV 40-transformierten 3T3-Zellen. Lediglich in dem Bereich von 34-45 Kd weist er in geringer Menge ein Protein mit 37 Kd sowie Actin (46 Kd) nach. Allerdings lassen sich die in der vorliegenden Arbeit mit der stufenweisen Elution aktiv adhärenter Zellstrukturen gewonnenen Ergebnisse nur bedingt mit denen anderer Autoren vergleichen, da eine selektive Adhäsionskapazität solcher Strukturen bisher nicht untersucht worden ist.

Die starke, selektive Adhäsionskapazität der beiden Protein- bzw. Phosphoprotein-Gruppen bedeutet für die Adhäsion möglicherweise, daß sich die Zellen dieser Proteine als terminale, hochspezifische Verankerung ihrer adhäsiven Strukturen am Serumprotein-bedeckten Substrat bedienen. Über den nativen Aufbau der zellulären Adhäsionsstrukturen bestehen aber noch keine einheitlichen Vorstellungen. Nach Culp (68) sollen an den Adhäsionskomplexen bei Fibroblastenzellen vor allem Glykosaminoglykan-haltige Proteoglykane, das LETS-Glykoprotein (Large external transformation-sensitive glycoprotein) sowie Plasmamembran-assoziierte Microfilamente beteiligt sein. Diese Vorstellung deckt sich weitgehend mit Rees (64). Allerdings ist bekannt, daß die Transformation normaler Fibroblastenzellen mit onkogenen Viren alle drei oben genannten Strukturelemente negativ beeinflussen kann, sei es deren Synthese, Stabilität (110-116), Oberflächen-

konzentration (117, 118) oder extensive Organisation (105, 119, 120). Außerdem soll allgemein das LETS-Protein stärker an die Zellen als an Substrat gebunden sein, sodaß in Substrat-adhärentem Material nur ein geringer Teil davon erscheint (121, 122). Daher ist es durchaus plausibel, daß in den untersuchten virus-transformierten Zellinien (STU-D17, STU51A/232B) zwar Proteine, Glykoproteine und sulfatierte Glykoproteine im Substrat-adhärenten Material enthalten sind, daß aber im Molekulargewichtsbereich des LETS-Proteins und der hochmolekularen Glykosaminoglykane nur geringe Mengen von spezifisch adhärenten Zellkomponenten zu finden sind.

Dennoch liessen sich Unterschiede in der Zusammensetzung der Substrat-adhärenten Komponenten zwischen den beiden untersuchten Zellinien (STU-D17, STU51A/232B) feststellen. Diese Zellinien unterscheiden sich durch das transformierende Virus (RSV bzw. SV 40) und zeigen eine merklich unterschiedliche Adhäsivität am Kultursubstrat. Die schwächer adhäsiven STU51A/232B-Zellen weisen im Vergleich zu den STU-D17-Zellen vor allem einen Mangel an hochmolekularen Komponenten (über 400 Kd) mit Fucose-, Glukosamin- oder Schwefel-Anteilen auf. Auch andere Molekulargewichtsbereiche zeigen bei den STU51A/232B-Zellen eine geringere radioaktive Markierung . Obwohl den fraglichen Komponenten nach den vorliegenden Ergebnissen der sequentiellen Elution keine ausgesprochen spezifische Adhäsionsfähigkeit zuge-

sprochen werden kann, liegt es doch nahe, das unterschiedliche Adhäsionsvermögen der beiden Zellinien partiell mit diesen Komponenten zu korrelieren. Eine direkte Abhängigkeit des Adhäsionsverhaltens der Zellen von der Natur des transformierenden Virus kann jedoch nicht abgeleitet werden, da bei der Isolierung der Zellinien unterschiedliche Selektionskriterien angewandt wurden.

Ein Einfluß des Kultursubstrats (Glas, Plastik) auf die Art und Zusammensetzung zellulärer Adhäsionskomponenten konnte nicht festgestellt werden. Möglicherweise liegen die spezifischen Wechselwirkungen, welche die Zellen mit ihren adhäsiven Strukturen an der festen Unterlage ausüben, zum Teil bei den adhärenten Serumproteinen und den Zellstrukturen. Dies wird auch durch die Notwendigkeit von adhärenten Serumproteinen bei einer aktiven, physiologischen Adhäsion bei den meisten Zellinien deutlich.

Die Tatsache, daß auch Suspensionskulturen von STU51A/232B-Zellen Substrat-adhärente Komponenten bilden, ohne daß eine permanente Adhäsion dieser Zellen vorliegt, läßt mehrere Interpretationsmöglichkeiten zu:1)Eine aktive Sezernierung dieser Komponenten (in geringer Menge) ins Medium, bei gleichzeitig hoher Adhäsionsfähigkeit am Substrat würde das nahezu vollständige Fehlen dieser Komponenten im Kulturmedium erklären. Auch Schubert (49) beobachtet eine Ablagerung von Substrat-adhärentem Material unabhängig von der Substrat-

Adhäsion bei bestimmten Zellen. 2) Andererseits scheint auch eine Adsorption durch Kurzzeitkontakt der schnell gerührten Zellen mit der Gefäßwand eine mögliche Ursache für das Auffinden der adhärenten Strukturen zu sein. Zwar ist die Dauer einzelner Stoßkontakte für den relativ langsamen Adhäsionsprozeß in der Regel sicher zu kurz für die Ausbildung adhärenter Strukturen, doch liegen aufgrund der unterschiedlichen hydrodynamischen Verhältnisse innerhalb der Gewebekulturflasche an bestimmten Zonen günstigere Bedingungen für ein längeres Verweilen der Zellen am Substrat vor. Diese Annahme scheint insbesondere dadurch berechtigt zu sein, daß es bei künstlich erhöhter Zelldichte in der Suspensionskultur trotz heftigen Rührens teilweise zum Festwachsen von Zellen kommt.

Weitere Untersuchungen über die adhäsiven Eigenschaften von Zellen müssen die Mechanismen der zellulären Adhäsion und deren Regulierung näher abklären. Dabei wird vor allem auch die genaue Darlegung des nativen Aufbaus adhäsiver Zellstrukturen am künstlichen Substrat eine wichtige Rolle für das Verständnis der fraglichen Vorgänge spielen. Schließlich bleibt abzuwarten, inwieweit das artifizielle experimentelle System der Zell-Substrat-Adhäsion aussagekräftig ist für die Erklärung der Phänomene, die bei der natürlichen Wechselwirkung zwischen Zellen und festen Körperoberflächen bzw. bei der Zell-Zell-Adhäsion auftreten.

V. Material und Methoden

Radioaktiv markierte Substanzen

L-(U-^{14}C)-Leucin (354 bzw. 342 mCi/mM), D-(6-^{3}H)-Glukosamin (20 - 40 Ci/mM) und ^{35}S (Na-Sulfat, trägerfrei) wurden von der Firma Amersham Buchler bezogen, L-(6-^{3}H)-Fucose (10 - 15 Ci/mM), L-(4,5-^{3}H(N))-Leucin (51.6 bzw. 120 Ci/mM) und γ-(^{32}P)-ATP (10 - 40 Ci/mM) von der Firma NEN.

Zellen

Suspensionskultur: STU51A/232B-Mäusefibroblasten, eine Sublinie SV 40-transformierter Embryonalzellen von STU-Mäusen (50), wurden bei 37°C in Suspension in 500 ml Wachstumsmedium (Dulbecco's Modification of Eagle's Minimal Medium) mit 10% Hitze-inaktiviertem foetalem Kälberserum unter einer Luft-Atmosphäre mit ca. 5% CO_2 unter schnellem Rühren (670-700 rpm) in 1l-Glasflaschen gezogen. Die Anfangszelldichte lag zwischen 1.5 und 2.5 x 10^6 Zellen/ml. Logarithmisches Wachstum der Zellen wurde durch Verdünnen der Zellsuspension in geeigneten zeitlichen Abständen mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem Medium erreicht. Die Wachstumsphase der Zellen wurde durch Bestimmung der Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer

und Bestimmung der Mitoserate mit der Kristallviolett-Färbung (123) ermittelt. Tote Zellen wurden durch Anfärben mit 1% Trypanblau-Lösung (124) identifiziert. Versuche wurden nur mit Kulturen durchgeführt, die weniger als 3% tote Zellen enthielten.

Plattenkultur: STU51A/232B-Zellen und STU-D17-Zellen wurden in Wachstumsmedium (Dulbecco's Modification of Eagle's Minimal Medium,mit Ca^{2+}) mit 10% Hitze-inaktiviertem foetalem Kälberserum unter einer Luft-Atmosphäre mit ca.5% CO_2 in Roux-Schalen (850 cm^2, ca. 80-100 ml Medium) und Falcon-dishes (75 cm^2, ca. 4o ml Medium) gezogen. Die Anfangszelldichte lag bei 1-2 x 10^4Zellen/cm^2. Die Wachstumsparameter der Zellen wurden,wie für die Suspensionskultur beschrieben, bestimmt. Die Zellen wurden dazu mit einer 0.025% Trypsin/ 0.05% EDTA-PBS-Lösung vom Substrat gelöst, abzentrifugiert (2 Min., 200 x g) und in PBS resuspendiert.

Isolierung der Plasmamembranen

Die Isolierung der Plasmamembranen erfolgte nach der $MgCl_2$-Methode von Joos (101). Das Prinzip dieser Methode basiert auf Schwellung der Zellen in hypotoner Lösung, Homogenisieren der Zellen in einem Homogenisator nach Dounce und Auftrennung der subzellulären Fraktion mittels Zentrifugation im kontinuierlichen Sucrosegradienten.
Dazu werden die suspendierten Zellen nach Abzentrifugieren

(5 Min., 200 x g) drei mal mit Saline und 1 Mal mit 1mM $MgCl_2$ gewaschen und bei einer Dichte von 5 x 10^7 Zellen/ml in 1 mM $MgCl_2$ suspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgt Abkühlen im Eisbad auf 0°C. Die Zellen schwellen dabei auf das 2-3fache ihres anfänglichen Volumens an. Die abgekühlten Zellen werden nun in einem Dounce-Homogenisator mit 5-10 Schlägen homogenisiert, bis mehr als 90% der Zellen zerstört sind. Die Zellkerne bleiben dabei intakt. Noch unzerstörte Zellen sowie Zellkerne werden durch 2malige Zentrifugation (2 Min., 200 x g, 4°C) aus dem Homogenat größtenteils entfernt. Die im Überstand suspendierten Membranen werden in einem Spinco Ti 30 Rotor durch 30 minütige Zentrifugation bei 30 000 rpm, 4°C sedimentiert. Das Membransediment wird in 5% (w/v) Sucrose suspendiert, die Membransuspension auf einen kontinuierlichen Gradienten von 20-60% (w/v) Sucrose aufgetragen (je 3 ml Membransuspension/ 10 ml Gradient) und in einem Spinco SW 40 Rotor 150 Minuten bei 30 000 rpm, 4°C zentrifugiert. Nach beendigter Zentrifugation haben sich im Gradienten 3 Membranfraktionen ausgebildet: Bei einer Dichte von 30% Sucrose liegt eine schmale Bande, bei 40% eine breitere, und dazwischen noch eine diffuse Zone. Wie Joos (101) zeigte, sind in der 30%-Bande Plasmamembran-Leitenzyme 14-18fach gegenüber dem Homogenat angereichert. Die 30%-Bande wird gesammelt, mit H_2O bidest. auf etwa 5% Sucrose verdünnt und die Membranvesikel in einem Spinco Ti 30 Rotor bei 30 000 rpm, 4°C in

60 Minuten sedimentiert. Die Membransedimente werden nach Waschen mit H_2O bidest. fein suspendiert in 1% SDS, 1% Mercaptoäthanol und 10 mM EDTA in 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.2, 5 Minuten im siedenden Wasserbad gekocht und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Analyse radioaktiv markierter Komponenten

Radioaktiv markierte Plasmamembranen und Substrat-adhärente, eluierte Komponenten wurden in 1% SDS, 1% Mercaptoäthanol und 10 mM EDTA in 0.01 M Phosphatpuffer pH 7.2 durch 5 Min. Kochen im siedenden Wasserbad gelöst. Ebenso wurde mit anderen zur Elektrophorese kommenden Proben verfahren. Die Elektrophorese der gelösten Komponenten wurde in 5%-Polyacrylamid-Gelen (5x90 mm) nach Weber und Osborn (125) durchgeführt. Die Gele wurden nach beendeter Elektrophorese in 25% Isopropanol 15 Minuten bei 50°C und über Nacht in frischem 25% Isopropanol bei Raumtemperatur fixiert und mit 0.25% Coomassie brilliant blue R 250 in Methanol/Eisessig/Wasser (5:1:5) 2 Stunden angefärbt. Nach Entfärben mit Methanol/Eisessig/Wasser (5:1:5) in 2 Stunden und mit 7.5% Eisessig/5% Methanol in 1-2 Tagen wurden die Gele in 7% Essigsäure aufbewahrt. Die Gele wurden nach Aufnahme von Densitogrammen mit einem Gilford-Gel-Scanner bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem Hexan-Trockeneis-Gemisch eingefroren und mit einer manuellen Gelschneidemaschine in ca.

1.5 mm dicke Scheibchen geschnitten. Proteine in den Scheibchen wurden durch 2-stündige Inkubation der Scheibchen bei 50°C mit jeweils 0.5 ml NCS/H_2O (9:1) (Nuclear Chicago) hydrolysiert. Nach Zugabe von 15 ml Toluol-Szintillator (5 g PPO und 0.1 g POPOP pro 1l Toluol) wurde die Radioaktivität in einem Packard-Flüssigkeitsszintillations-Zähler bestimmt.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte der elektrophoretisch getrennten Komponenten wurden durch Vergleich ihrer R_f-Werte in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit der in Abb.32 wiedergegebenen Eichkurve ermittelt.
Als Eichproteine wurden verwendet: 1) KI,2)RNAse 3) Lysozym,4) TMV-Phenolprotein (Monomer), 5) IgG-L-Kette, 6) Pepsin, 7) TMV-Phenolprotein (Dimer), 8) Orosomucoid (Monomer), 9) Ovalbumin (Monomer),10) IgG-H-Kette, 11) TMV-Phenolprotein (Trimer), 12) Serumalbumin (RSA, Monomer), 13) Transferrin, 14) Ovalbumin (Dimer), 15) Phosphorylase a, 16) Orosomucoid (Dimer), 17) ß-Galaktosidase, 18) RSA (Dimer), 19) IgG (undissoziiert), 20) RSA (Trimer), 21) RSA (tetramer), 22) Thyroglobulin, 23) RSA (Pentamer), 24) RSA (Hexamer) und Fibrinogen. Die Molekulargewichte dieser Proteine wurden Tabellen entnommen (125, 126).

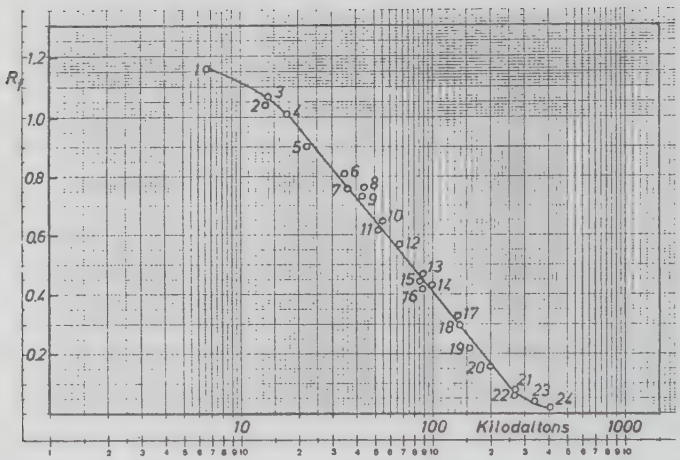

Abb.32. Legende siehe Seite 107.

In vivo-Markierungen

In vivo-Markierungen der Zellkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase erfolgten durch Inkubation der Zellkulturen mit Kulturmedium, dem ^{3}H- bzw. ^{14}C-Leucin, ^{3}H-Fucose, ^{3}H-Glukosamin oder $Na_2{}^{35}SO_4$ nach Bedarf zugesetzt wurden. Dabei wurde während der insgesamt ca. 60 stündigen

Inkubation der Zellen bei den Zellen in Plattenkultur nach 20 und 40 Stunden das Kulturmedium durch eine frische Charge mit neu hinzugegebener Radioaktivität ersetzt, während bei den Zellen in Suspensionskultur der zur Aufrechterhaltung des logarithmischen Wachstumszustands verdünnten Zellsuspension jeweils entsprechende Mengen an Radioaktivität hinzugefügt wurden.

Endogene Phosphorylierung der adhärenten Komponenten

Nach Ablösung der adhärenten Zellen von dem Kultursubstrat erfolgte die Phosphorylierung der am Substrat haftenden adhärenten Zellkomponenten mit insgesamt 2 mCi (^{32}P)-ATP. Die Phosphorylierung mehrerer Roux-Schalen wurde seriell mit der gleichen Phosphorylierungs-Lösung durchgeführt. Die Kulturgefäße wurden dazu 10 Minuten bei 37°C mit einem Volumen von 5 ml eines Glycin/Phosphat-Puffers (25mM Glycin, 25 mM Phosphat, 10 mM $MgCl_2$, 0.3 mM EGTA, pH 8.0), der 2 mCi (^{32}P)-ATP enthielt, inkubiert. Nach Dekantieren des (^{32}P)-ATP-haltigen Puffers wurde die Phosphorylierungsreaktion gestoppt durch Zugabe des 1.Elutionspuffers (1% SDS, 10 mM Tris/EDTA, 2 mM PMSF, 1% Mercaptoäthanol, pH 9.0) und das Substrat sofort anschließend wie beschrieben von den adhärenten Komponenten eluiert.(s.Kap.2.3.1).

Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte nach der Methode von Lowry et al.(127).

Aminosäure/Hexosamin-Analyse

Die zu untersuchenden Proben wurden als 0.1-0.2%ige Proteinlösungen in 6 N HCl bei 110°C unter Stickstoff 24 Stunden hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde die Salzsäure im Vakuum über NaOH-Pastillen entfernt. Der Rückstand wurde in 0.2 M Citratpuffer, pH 2.2, aufgenommen und mit einem automatischen Aminosäuren-Analysator (Modell 120 C, Beckman Instruments) untersucht. Fragliche Fraktionen der Analysator-Säuleneluate wurden mit Dioxan-Szintillator versetzt und auf ihren Gehalt an radioaktiver Markierung im Packard-Flüssigkeitsszintillations-Zähler überprüft.

VI. Literaturverzeichnis

1. Holtfreter, J.,
Ann. N.Y. Acad. Sci. 49, 709 (1948)

2. Holtfreter, J.,
In "Epithelial-Mesenchymal Interactions"(R.Fleischmajer, R.E.Billingham, Hrsg.), S.1 (1968), Williams u.Wilkins, Baltimore

3. Trinkaus, J.P.,
Dev. Biol.7, 513 (1963)

4. Trinkaus, J.P.,
"Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo", (1969), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey

5. Gustafson, T.,
Locomotion Tissue Cells, Ciba Found. Symp.1972 No.14 (N.S.), S.271 (1973)

6. Trinkaus, J.P.,
Locomotion Tissue Cells, Ciba Found. Symp.1972 No.14 (N.S.), S.231 (1973)

7. Khodadoust, A.A., Silverstein, A.M., Kenyon, K.R., Dowling, J.E.,
Am. J. Ophthalmol. 65, 339 (1968)

8. Krawczyk, W.S.,
J. Cell Biol. 49, 247 (1971)

9. Weiss, P.A.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 42, 819 (1956)

10. Croft, C.B., Tarin,D.,
J. Anat. 106, 63 (1970)

11. Odland, G., Ross, R.,
J. Cell Biol. 39, 135 (1968)

12. Ryan, G.B., Majno, G.,
Am. J. Pathol. 86, 184 (1977)

13. Marchesi, V.T., Florey, H.W.,
Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci. 45, 343 (1960)

14. Luft, J.H.,
Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 25, 1773 (1966)

15. Grinnell, F.,
Int. Review of Cytology, Vol.53, Acad. Press, N.Y.,
S. 65 (1978)

16. Cowdry, E.V.,
Arch. Pathol. 30, 1245 (1940)

17. Coman, D.R.,
Cancer Res. 4, 625 (1944)

18. Fidler, I.J.,
Cancer (F.F.Becker, ed.), Vol.4, S.101, Plenum,N.Y.,
(1975)

19. Fadei, L.,
Oncology 31, 92 (1975)

20. Stäuli, P., Weiss, L.,
Eur. J. Cancer 13, 1 (1977)

21. Luibel, F.J., Sanders, E., Ashworth, C.T.,
Cancer Res. 20, 357 (1960)

22. Mc Nutt, N.S.,
Lab.Invest.,35, 132 (1976)

23. Willis, R.A.,
Pathology of Tumors, London, Appleton-Century-Crofts, p. 163 (1967)

24. Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S., Waxman, V.,
Br. J. Cancer 3, 683 (1968)

25. MacPherson, I., Montagnier, L.,
Virology 23, 291 (1964)

26. Gail, M.H., Boone, C.W.,
Exp. Cell Res. 70, 33 (1972)

27. Weiss,L.,
Frontiers of Biology, Vol. 7,
(A. Neuberger, E.L. Tatum, eds.), North Holland,
Amsterdam, (1967)

28. Unhjem, O., Prydz, H.,
Exp. Cell Res. 83, 418 (1973)

29. Taylor, A.C.,
Exp. Cell Res., Suppl. 8, 154 (1961)

30. Witkowski, J.A., Brighton, W.D.,
Exp. Cell Res. 70, 41 (1972)

31. Carter, S.B.,
Nature (London) 213, 256 (1967)

32. Wolpert, L., MacPherson,I., Todd, I.,
Nature (London) 223, 513 (1969)

33. Nordling, S.,
Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl. 192, 1 (1967)

34. Rabinovitch, M., De Stefano, M.J.,
J. Cell Biol. 59, 165 (1973)

35. Takeichi, M., Okada, T.S.,
Exp. Cell Res. 74, 51 (1972)

36. Grinnell, F.
In "Membranes and Neoplasia: New Approaches and Strategies"(V.T.Marchesi, Hrsg.),S.227 (1976), Alan R. Liss, Inc., N.Y.

37. Yaoi, Y., Kaneseki, T.,
Nature 237, 283 (1972)

38. Bolund, L., Darzynkiewicz, Z., Ringertz, N.R.,
Exp. Cell Res. 62, 76 (1970)

39. Martin, G.R., Rubin, H.,
Exp. Cell Res. 85, 319 (1974)

40. Culp, L.A., Black, P.H.,
Biochemistry 11, 2161 (1972)

41. Terry, A.H., Culp, L.A.,
Biochemistry 13, 414 (1974)

42. Mapstone, T.B., Culp, L.A.,
J. Cell Sci. 20, 479 (1976)

43. Culp, L.A.,
J. Cell Biol. 63, 71 (1974)

44. Culp, L.A., Buniel, J.F.,
J. Cell. Physiol. 88, 89 (1976)

45. Weiss, L., Poste, G., Mackearnin, A., Willett, K.,
J. Cell Biol. 64, 135 (1975)

46. Fromme, H.G., Buddecke, E., von Figura, K.,Kresse, H.,
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 356, 929 (1975)

47. Culp, L.A.,
Biochemistry 15, 4094 (1976)

48. Yamada, K., Yamada, S., Pastan, I.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1217 (1976)

49. Schubert, D.,
Brain Res. 132, 337 (1977)

50. Kulas, H.P., Marggraf, W.D., Koch, M.A., Diringer,H.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1755 (1972)

51. Kulas, H.P., Anderer, F.A.,
Z. Naturforsch. 31c, 179 (1976)

52. Witkowski, J.A., Brighton, W.D.,
Exp. Cell Res. 68, 372 (1971)

53. Rajaraman, R., Rounds, D.E., Ken, S.P.S.,Rembaum, A.,
Exp. Cell Res. 88, 327 (1974)

54. Abercrombie, M., Heaysman, J.E.M., Pegrum, S.M.,
Exp. Cell Res. 67, 359 (1971)

55. Abercrombie, M.,
Exp. Cell Res. (Suppl.) 8, 188 (1961)

56. Ambrose, E.J.,
Exp. Cell Res. (Suppl.) 8, 54 (1961)

57. Cornell, R.,
Exp. Cell Res. 58, 289 (1969)

58. Taylor, A.C.,
In "Adhesion in Biological Systems"(R.S.Manly, Hrsg.),
S. 51 (1970), Acad. Press, N.Y.

59. Revel, J.P., Hoch, P., Ho, D.,
Exp. Cell Res. 84, 207 (1974)

60. Revel, J.P., Wolken, K.,
Exp. Cell Res. 78, 1 (1973)

61. Price, P.G.,
J. Membr. Biol. 2, 300 (1970)

62. Liebrich, W., Paweletz, N.,
Cytobiologie 12, 321 (1976)

63. Grinnell, F., Tobleman, M.Q., Hackenbrock, C.R.,
J. Cell Biol. 70, 707 (1976)

64. Rees, D.A., Badley, P.A., Lloyd, C.W., Thom, D.,
Smith, C.G.,
In"Cell-Cell Recognition", Symp. Soc. Exp. Biol.
(1978), S.241 , Cambridge Univ. Press

65. Rees, D.A., Lloyd, C.W., Thom, D.,
Nature (London) 267, 124 (1977)

66. Santala, R., Gottlieb, D.I., Littman,D.,Glaser, L.,
J. Biol. Chem. 252, 7625 (1977)

67. Grinnell, F.,
Arch. Biochem. Biophys. 169, 474 (1975)

68. Culp, L.A.,
In" Current Topics in Membrane and Transport", Vol. 11,
S. 327 (1978), Acad. Press, N.Y.

69. Weiss, L.,
Exp. Cell Res. 83, 311 (1974)

70. Wickus, G.G., Branton, P.E., Robbins, P.W.,
In" Control of Proliferation in Animal Cells"
(B.Clarkson, R.Baserga, Hrsg.), S.541 (1974),
Cold Spring Harbor Laboratory

71. Grinnell, F.,
Arch. Biochem. Biophys. 160, 304 (1974)

72. Rappaport, C.,
In "Chemistry of Biosurfaces" (M.L.Hair,Hrsg.),
Vol.2, S.449 (1971), Decker, N.Y.

73. Maroudas, N.G.,
J. Cell. Phys. 90, 511 (1977)

74. Weiss, L., Blumenson, L.E.,
J. Cell. Physiol. 70, 23 (1967)

75. Grinnell, F., Milam, M., Srere, P.A.,
Arch. Biochem. Biophys. 153, 193 (1972)

76. Grinnell, F., Milam, M., Srere, P.A.,
Biochem. Med. 7, 87 (1973)

77. Rosenberg, M.,
Biophys. J. 1, 137 (1960)

78. Weiss, L.,
Exp. Cell Res. 25, 504 (1961)

79. Takeichi, M.,
Exp. Cell Res. 68, 88 (1971)

80. Grinnell, F.,
Exp. Cell Res. 102, 51 (1976)

81. Grinnell, F.,
Exp. Cell Res. 97, 265 (1976)

82. Rosen, J.J., Culp, L.A.,
Exp. Cell Res. 107, 139 (1977)

83. Bosmann, H.B., Hagopian, A., Eylar, E.H.,
Arch. Biochem. Biophys. 130, 573 (1969)

84. Kaufman, R.L., Ginsburg, V.,
Exp. Cell Res. 50, 127 (1968)

85. Atkinson, P.H.,
In "Methods in Cell Biol.", Vol.7, S.158 (1973),
Acad. Press, N.Y.

86. Atkinson, P.H., Summers, D.F.,
J. Biol. Chem. 246, 5162 (1971)

87. Weiss, L., Glaves, D.,
J. Immunol. 115, 1362 (1975)

88. Evans, W.H.,
In "Preparation and Characterisation of Mammalian Plasma Membranes", S. 168 (1978), North-Holland Publ. Comp., Amsterdam

89. Lazarides, E.,
J. Cell Biol. 68 (2), 202 (1976)

90. Willingham, M.C., Ostlund, R.E., Pastan, I.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4144 (1974)

91. Olden, K., Willingham, M., Pastan, I.,
Cell 8, 383 (1976)

92. Goldman, R.,(Hrsg.),
"Cell Motility" (1976), Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, CSH Laboratory

93. Dornfield, E.J., Owczarzak, A.,
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 243 (1958)

94. Weiss, P.A.,
In "Biological Interactions in Normal and Neoplastic Growth"(M.J.Brennan,W.L.Simpson,Hrsg.),S.3 (1962), Little, Brown, Boston , Massachusetts

95. Jones, B.M.,
Nature 212, 362 (1966)

96. Agrén, G., Pontén, J., Ronquist, G., Westermark, B.,
J. Cell. Physiol. 78, 171 (1971)

97. Trams, E.G.,
Nature 252, 480 (1974)

98. Ronquist, G., Agrén, G.K.,
Cancer Res. 35, 1402 (1975)

99. Greengard, P.,
Science 199, 146 (1978)

100. Greengard, P.,
Nature 260, 101 (1976)

101. Joos, T.F.,
Doktorarbeit, Tübingen 1977

102. Joos, T., Anderer, F.A.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 757 (1979)

103. Rubin, C.S., Rosen, O.M.,
Ann. Rev. Biochem. 44, 831 (1975)

104. Joos, T.F., Anderer, F.A.,
Biochim. Biophys. Acta 584, 104 (1979)

105. McNutt, N.S., Culp, L.A., Black, P.H.,
J. Cell Biol. 50, 691 (1971)

106. Goldman, R.D.,
J. Histochem. Cytochem. 23, 529 (1975)

107. McNutt, N.S., Culp, L.A., Black, P.H.,
J. Cell Biol. 56, 412 (1973)

108. Heath, J.P., Dunn, G.A.,
J. Cell Sci. 29, 197 (1978)

109. Culp, L.A.,
J. Supramol. Structure 5, 239 (191), (1976)

110. Defendi, V., Gasic, G.,
J. Cell. Comp. Physiol. 62, 23 (1963)

111. Hamerman, D., Todaro, G.J., Green, H.,
Biochim. Biophys. Acta 101, 343 (1965)

112. Kraemer, P.M.,
In"Biomembranes" (L.A. Manson, Hrsg.), Vol. 1, S. 67,
(1971), Plenum, N.Y.

113. Goggins, J.F., Johnson, G.S., Pastan, I.,
J. Biol. Chem. 247, 5759 (1972)

114. Roblin, R., Albert, S.O., Gelb, N.A., Black, P.H.,
Biochemistry 14, 347 (1975)

115. Underhill,C.B., Keller, J.M.,
J. Cell.Physiol. 89, 53 (1976)

116. Cohn, R.H., Cassiman, J., Bernfield, M.R.,
J. Cell Biol. 71, 280 (1976)

117. Pearlstein, E., Hynes, R.O., Franks, L.M., Hemmings, V.J.,
Cancer Res. 36, 1475 (1976)

118. Chen, L.B., Gallimore, P.H., McDougall, J.K.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3570 (1976)

119. Pollack, R., Osborn, M., Weber, K.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 994 (1975)

120. Altenburg, B.C., Somers, K., Steiner, S.,
Cancer Res. 36, 251 (1976)

121. Yamada, K.M., Pastan, I.,
Trends in Biochemical Sciences 1, 222 (1976)

122. Ali, I.U., Mautner, V., Lanza, R., Hynes, R.O.,
Cell 11, 115 (1977)

123. Schindler, R., Ramseier, L., Schaer, J.C., Grieder, A.,
Exp. Cell Res. 59, 90 (1970)

124. Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G.,
Virologische Arbeitsmethoden, Band I, Gustav-Fischer-
Verlag, Stuttgart (1974)

125. Weber, K., Osborn, M.,
In "The Proteins" (Neurath, N., Hill, R.J.(Hrsg.)),
S. 179 (1975), Acad. Press, N.Y.

126. Darnall, D.W., Klotz, I.M.,
Arch. Biochem. Biophys. 166, 651 (1975)

127. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

Lebenslauf

Am 4. Juni 1949 wurde ich in Ravensburg als Sohn des Dr.med. vet. Josef Hagmann und dessen Ehefrau Elisabeth Hagmann, geb.Denzler geboren. Ab Frühjahr 1956 besuchte ich die Grundschule in Ravensburg, danach ab dem Frühjahr 1960 das Spohn-Gymnasium in Ravensburg. Nach dem Abitur im Sommer 1968 begann ich im Wintersemester 1968/69 an der Universität Tübingen das Studium der Biochemie. Im Oktober 1969 legte ich den ersten Teil der Diplom-Vorprüfung ab. Von Oktober 1971 bis Juli 1972 studierte ich Biochemie an der Universität in Liverpool, England. Im Oktober 1973 legte ich den zweiten Teil der Diplom-Vorprüfung an der Universität Tübingen ab, im September 1976 die mündliche Prüfung zur Diplom-Hauptprüfung. Von November 1976 bis Mai 1977 arbeitete ich am Tübinger Institut für Physiologische Chemie und Biochemie unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.H.Probst an meiner Diplomarbeit mit dem Thema "Versuche zur Fraktionierung von Chromatin aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen". Von Oktober 1977 bis September 1979 arbeitete ich am Tübinger Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.F.A.Anderer an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren:

F.A.Anderer, E.Bayer, V.Braun, K.G.Grell, P.Hausen, H.Krüger, H.Mauser, D.Mecke, H.Metzner, K.Mörike, E.Müller, H.Ninnemann, C.Pelling, H.Probst, H.Remmer, W.Rüdorff, W.Schlote, H.Seiler, V.Schwartz, W.Schweizer, F.F.Seelig, W.Seyffert, U.Weber, G.Weitzel, U.Weser, H.Zähner.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791